

**TAMARA MONTES FERNÁNDEZ**



**INGENIERÍA DE LA SUPERFICIE DE LA PENICILINA G  
ACILASA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS  
DE INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctora  
por la Universidad Autónoma de Madrid**

**DIRECTORES**  
**JOSE MANUEL GUISÁN SEIJAS**  
**ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE**  
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica  
C.S.I.C., Madrid



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Madrid, 2006

# ÍNDICES

---

---

<b>ÍNDICES.....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
 <b>INTRODUCCIÓN .....</b>	 <b>2</b>
 <b>1. LA BIOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO DE NUEVOS PROCESOS SOSTENIBLES .....</b>	 <b>3</b>
1.1 Búsqueda del biocatalizador “ideal”. Tecnología enzimática.....	3
<b>2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS .....</b>	<b>4</b>
2.1 Inmovilización por enlace covalente. Características.....	5
2.1.1 Unión covalente multipuntual sobre soportes agarosa glioxil. ....	6
2.1.2 Unión covalente sobre soportes activados con grupos epóxido.....	8
2.2 Inmovilización reversible por adsorción iónica.....	11
2.2.1 Inmovilización reversible sobre soportes poliméricos iónicos. ....	13
<b>3. PAPEL DE LA SUPERFICIE ENZIMÁTICA EN LA INMOVILIZACIÓN: INGENIERÍA DE LA SUPERFICIE PROTEICA .....</b>	<b>16</b>
3.1 Modificación química de la superficie enzimática.....	17
3.1.1 Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina.....	18
3.1.2 Carboxilación química de grupos amino con anhídrido succínico..	18
3.2 Mutagénesis dirigida de la superficie enzimática.....	20
<b>4. DESARROLLO DE NUEVOS Y MEJORES MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN TRAS LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA ENZIMÁTICA.....</b>	<b>21</b>
4.1 Desarrollo de una inmovilización covalente multipuntual muy intensa....	21
4.2 Desarrollo del aumento de la adsorción proteica sobre poliméricos iónicos.....	21
4.3 Desarrollo de derivados enzimáticos rodeados de microambientes altamente hidrofílicos. ....	23
4.4 Desarrollo de una estrategia para el estudio de nuevas zonas para la inmovilización covalente multipuntual.....	24

<b>5. PENICILINA G ACILASA (PGA) DE <i>E. coli</i></b> .....	<b>25</b>
5.1 Biología, estructura y función de la PGA.....	26
5.2 Interés industrial de la PGA. ....	30
5.3 Desarrollo de nuevos derivados de PGA.....	32
 <b>OBJETIVOS</b> .....	 <b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
 <b>1. REACTIVOS</b> .....	 <b>36</b>
<b>2. CEPAS DE <i>E. coli</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3. VECTORES</b> .....	<b>37</b>
<b>4. MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	<b>38</b>
<b>5. OLIGONUCLEÓTIDOS</b> .....	<b>38</b>
<b>6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PGA</b> .....	<b>38</b>
6.1 Determinación con ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico .....	40
6.2 Determinación con Penicilina G-K como sustrato.....	40
<b>7. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE DE LA PGA</b> .....	<b>41</b>
7.1 Modificación de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA). ....	41
7.1.1 Aminación de la PGA soluble. ....	41
7.1.2 Aminación de la PGA inmovilizada. ....	41
7.2 Modificación de grupos amino con anhídrido succínico. ....	42
7.2.1 Succinilación de PGA soluble. ....	42
7.2.2 Succinilación de PGA inmovilizada.....	42
7.3 Determinación del número de grupos amino primarios.....	43
<b>8. DINÁMICA MOLECULAR EN LA ESTRUCTURA DE LA PGA</b> .....	<b>43</b>
8.1 Análisis de la superficie proteica e introducción de mutaciones. ....	43
8.2 Predicción de la alteración de la estructura tridimensional por las mutaciones introducidas. ....	45
<b>9. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS</b> .....	<b>46</b>
9.1 Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas.....	46
9.2 Transformación por electroporación. ....	46

9.3 Transformación por choque térmico.....	46
<b>10. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>47</b>
10.1 Extracción de plásmidos de cepas de <i>E. coli</i> .....	47
10.2 Precipitación de DNA.....	47
10.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa. ....	49
10.4 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa. ....	49
10.5 Mutagénesis dirigida. ....	49
10.5.1 Mutantes de PGA con un solo residuo mutado.....	50
10.5.2 Mutantes de PGA con más de un residuo mutado.....	51
10.6 Clonación en el vector de expresión pet101/D-TOPO®.....	54
10.7 Cuantificación de DNA plasmídico. ....	54
10.8 Selección de transformantes. Análisis de restricción con <i>EcoRV</i> . ....	55
10.9 Secuenciación de DNA. ....	56
<b>11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y PURIFICACIÓN. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>56</b>
11.1 Fermentación de PGA nativa y mutantes en <i>E. coli</i> BL21.....	56
11.2 Purificación de PGA nativa y mutantes. ....	57
11.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). ....	58
11.4 Determinación del punto isoelectrónico (isoelectroenfoque). ....	59
11.5 Determinación de la concentración de proteína. ....	59
<b>12. PREPARACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN .....</b>	<b>59</b>
12.1 Soportes glioxil. ....	59
12.2 Soportes agarosa polietilenimina (PEI). ....	59
12.3 Soportes agarosa dextrano sulfato (DS). ....	60
12.4 Soportes Eupergit-tiol. ....	60
<b>13. PROTOCOLOS DE INMOVILIZACIÓN .....</b>	<b>60</b>
13.1 Inmovilización irreversible por unión covalente. ....	61
13.1.1 Inmovilización sobre Sepharose 4B activada con BrCN. ....	61
13.1.2 Inmovilización sobre agarosa glioxil. ....	61
13.1.3 Inmovilización sobre Eupergit C.....	61

13.1.4 Inmovilización sobre Eupergit-tiol.....	62
13.2 Inmovilización reversible por adsorción a intercambiadores iónicos.....	62
13.3 Combinación de inmovilización reversible e irreversible. ....	62
13.3.1 Adsorción de PEI sobre derivados agarosa-glioxil.....	62
13.3.2 Coinmovilización de enzima y PEI sobre soportes agarosa-glioxil.	63
13.3.3 Entrecruzamiento con glutaraldehído de las enzimas adsorbidas .	63
 <b>14. ESTUDIO DE LA FUERZA DE UNIÓN DE LA ENZIMA A SOPORTES</b>	
<b>IÓNICOS .....</b>	<b>63</b>
<b>15. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS...</b>	<b>64</b>
15.1 Estabilidad térmica.....	64
15.2 Estabilidad frente a codisolventes.....	64
<b>16. INHIBICIÓN POR CODISOLVENTES.....</b>	<b>64</b>
 <b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE</b>	
<b>LA PENICILINA G ACILAS DE E. coli CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO.....</b>	<b>65</b>
1.1 Análisis de los residuos susceptibles de modificación.....	65
1.2 Caracterización de la PGA succinilada.....	66
1.2.1 Control del grado de succinilación química.....	66
1.2.2 Efecto de la succinilación en la actividad catalítica.....	67
1.2.3 Efecto de la succinilación la estabilidad térmica de la PGA.....	68
1.3 Inmovilización reversible de la PGA succinilada sobre intercambiadores aniónicos.....	68
1.3.1 Cinética de inmovilización sobre DEAE agarosa y PEI agarosa. ..	69
1.3.2 Estudio de la fuerza de unión al soporte.....	69
1.3.3 Estabilidad térmica de preparaciones inmovilizadas de PGA succinilada.....	71
1.3.4 Estabilidad de las preparaciones inmovilizadas de PGA succinilada en presencia de codisolvente.....	71
1.4 Inmovilización irreversible de PGA succinilada sobre agarosa PEI y su entrecruzamiento con glutaraldehído.....	72

1.4.1 Estabilidad térmica y en disolventes de los derivados de PGA succinilada entrecruzados con glutaraldehído. ....	73
<b>2. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE PENICILINA G ACILASA DE <i>E. coli</i> CON ETILENDIAMINA (EDA).....</b>	<b>75</b>
2.1 Análisis de los residuos susceptibles de modificación .....	75
2.2. Caracterización de la PGA aminada.....	75
2.2.1 Control del grado de aminación química.....	75
2.2.2 Efecto de la aminación en la actividad de la PGA tanto soluble como inmovilizada sobre glioxil agarosa. ....	75
2.2.3 Estabilidad térmica de la enzima aminada soluble. ....	76
2.3 Inmovilización de PGA aminada sobre soportes agarosa-glioxil. Unión covalente multipuntual. ....	77
2.3.1 Efecto del pH en la cinética de inmovilización. ....	77
2.3.2 Estabilidad frente a temperatura, pH y disolventes orgánicos.....	78
2.3.3 Efecto del pH de inmovilización en la estabilidad térmica.....	80
2.4 Inmovilización por adsorción iónica sobre intercambiadores catiónicos. ....	81
2.4.1 Cinética de inmovilización sobre CMA y DSA. ....	81
2.4.2 Estudio de fuerza de unión de las enzimas al soporte iónico.....	82
2.4.3 Estabilidad térmica de las diferentes derivados de PGA aminada..	83
2.4.4 Estabilidad frente a codisolvente de derivaodos de PGA aminada. ....	83
2.4.5 Estudio de la inhibición por dioxano de derivados de PGA aminada. ....	84
<b>3. AUMENTO DE GRUPOS CARBOXILO EN LA SUPERFICIE DE PENICILINA G ACILASA DE <i>E. coli</i> POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA .....</b>	<b>85</b>
3.1 Obtención del mutante enriquecido en 8 glutámicos (PGA 8glu).....	85
3.1.1 Diseño y selección de residuos a mutar. ....	85
3.1.2 Análisis del efecto de las mutaciones en la estructura tridimensional de la PGA. ....	86
3.1.3 Producción, purificación y caracterización del mutante PGA 8glu	88
3.2 Inmovilización reversible sobre intercambiadores aniónicos. ....	91
3.2.1 Estudio de la inmovilización sobre agarosa DEAE y agarosa PEI	91
3.2.2 Estudio de la fuerza de unión al soporte .....	92

3.2.3 Estudio de envejecimiento del derivado para mejorar la adsorción	92
3.2.4 Inmovilización sobre agarosa-PEI de distintos tamaños y estudio de la fuerza de unión al soporte.....	93
3.2.5 Estabilidad frente a disolventes de los derivados PGA 8 glu adsorbidos sobre intercambiadores aniónicos.....	94
3.2.6 Optimización de la adsorción de PGA 8glu a soportes agarosa PEI.	94
3.3 Nuevos derivados de PGA coinmovilizada con PEI.....	96
3.3.1 Inmovilización de PGA nativa y PGA8glu sobre soportes agarosa glioxil.....	96
3.3.2 Preparación de un derivado agarosa glioxil-PGA 8glu recubierto con PEI.....	97
3.3.3 Preparación de un derivado agarosa glioxil-PGA 8glu coinmovilizado con PEI.....	99
3.4 Estudio de la estabilidad frente a codisolventes de los distintos derivados obtenidos con PGA 8glu. ....	100
<b>4. AUMENTO DE GRUPOS NUCLEÓFILOS EN LA SUPERFICIE DE PGA DE <i>E. coli</i> POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....</b>	<b>101</b>
4.1 Generación de nuevas zonas en la superficie proteica para lograr la inmovilización covalente multipuntual.....	101
4.1.1 Diseño y selección de residuos a mutar. ....	101
4.1.2 Análisis del efecto de las mutaciones en la estructura tridimensional de la PGA. ....	105
4.1.3 Producción, purificación y caracterización de los mutantes PGAsup y PGApst.....	106
4.2 Inmovilización covalente multipuntual de los PGAsup y PGApst.....	109
4.2.1 Inmovilización covalente sobre Eupergit.....	109
4.2.2 Inmovilización covalente sobre soportes bifuncionales Eupergit-tiol.	112
4.2.3 Inmovilización covalente sobre glioxil agarosa.....	114
4.3 Inmovilización reversible sobre soportes aniónicos.....	116
4.3.1 Inmovilización de PGA B437 sobre CMA y DSA.....	117
4.3.2 Estudio de la fuerza de unión de la PGA B437 al soporte.....	117
4.3.3 Estabilidad frente a agentes desnaturalizantes.....	118



## DISCUSIÓN

<b>1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE DE LA PGA DE <i>E. coli</i>.</b>	<b>119</b>
1.1 Succinilación de los grupos $\epsilon$ -amino de las lisinas. ....	120
1.2 Aminación de los grupos carboxilo de aspárticos y glutámicos. ....	123
1.2.1 Derivados agarosa-glioxil optimizados y más estables. ....	123
1.2.2 Nuevos derivados de PGA adsorbidos sobre intercambiadores catiónicos. ....	125
<b>2. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LA SUPERFICIE DE LA PGA EN EL DISEÑO DE NUEVOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS.....</b>	<b>127</b>
2.1 Incremento en 8 glutámicos en la superficie de la PGA (PGA 8glu). ....	129
2.1.1 Nuevos derivados de PGA 8glu adsorbidos sobre intercambiadores aniónicos.....	130
2.1.2 Nuevos derivados de PGA 8glu por coinmovilización con PEI. ....	132
2.2 Aumento de grupos nucleófilos en la superficie de la PGA. ....	134
2.2.1 Mutantes PGAsup y PGApst en el diseño de nuevas zonas para la inmovilización covalente multipuntual. ....	136
2.2.2 Derivados de PGA sup y PGA post sobre soportes Eupergit y Eupergit-tiol.....	137
2.2.3 Falta de congruencia enzima soporte Eupergit. Inmovilización sobre agarosa glioxil .....	139
2.2.4 Inmovilización reversible sobre soportes aniónicos. ....	141
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>166</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b>	Principales aplicaciones industriales de las enzimas.....	3
<b>Figura 2.</b>	Las propiedades de la enzima inmovilizada.....	4
<b>Figura 3.</b>	Métodos de inmovilización.....	5
<b>Figura 4.</b>	Inmovilización covalente multipuntual sobre soportes agarosa glioxil.....	8
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de inmovilización sobre resinas epoxiacrílicas.....	10
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo de inmovilización sobre soportes heterofuncionales tiol-epóxido.....	11
<b>Figura 7.</b>	Estructura de los distintos intercambiadores iónicos agarosa- DEAE, agarosa-CM, agarosa-PEI; agarosa-DS.....	13
<b>Figura 8.</b>	Adsorción sobre soportes convencionales.....	15
<b>Figura 9.</b>	Mecanismo de aminación química de grupos carboxilo (A) y carboxilación (B) química de grupos amino.....	19
<b>Figura 10.</b>	Estrategias desarrolladas tras la modificación de la superficie enzimática.....	22
<b>Figura 11.</b>	Clasificación de las penicilina acilasas según su preferencia de sustrato.....	25
<b>Figura 12.</b>	Mecanismo catalítico de la PGA.....	27
<b>Figura 13.</b>	Síntesis y maduración de la PGA de <i>E.coli</i> .....	28
<b>Figura 14.</b>	Estructura PGA madura.....	29
<b>Figura 15.</b>	Especificidad de sustrato de la penicilina G acilasa.....	30
<b>Figura 16.</b>	Hidrólisis de penicilina G para la obtención de 6-APA.....	31

### MATERIAL Y METODOS

<b>Figura 1.</b>	Vector de expresión pET/TOPO 101 .....	37
<b>Figura 2.</b>	Hidrólisis enzimática de NIPAB por la PGA .....	40
<b>Figura 3.</b>	Obtención del modelo estructural de mutantes mediante simulación por dinámica molecular.....	45
<b>Figura 4.</b>	Secuencia del gen <i>pac</i> de PGA de <i>E. coli</i> cepa ATCC11005.....	48
<b>Figura 5.</b>	Estrategia de mutagénesis dirigida de un solo nucleótido.....	50

<b>Figura 6.</b>	Vector de expresión pET/TOPO 101 empleado en la clonación del gen <i>pac</i> .....	52
<b>Figura 7.</b>	Clonaje direccional en vector de expresión pET101/D-TOPO.....	55
<b>Figura 8.</b>	Mapa de restricción.....	56
<b>Figura 9.</b>	Protocolo de fermentación de PGA nativa y mutantes en <i>E. coli</i> BL21.....	57

## RESULTADOS

<b>Figura 1.</b>	Estructura tridimensional de la Penicilina G acilasa de <i>E.coli</i> .....	65
<b>Figura 2.</b>	Número de residuos ionizables en la PGA.....	66
<b>Figura 3.</b>	Efecto de la succinilación de la PGA en la actividad catalítica en la enzima soluble y en la inmovilizada sobre agarosa-BrCN.....	67
<b>Figura 4.</b>	Curso de inactivación térmica de las distintas PGAs succiniladas y la PGA sin modificar.....	68
<b>Figura 5.</b>	Curso de inmovilización sobre DEAE agarosa y PEI 25kD agarosa de la las distintas PGAs succiniladas y la PGA sin modificar.....	69
<b>Figura 6.</b>	Desorción de las distintas PGAs succiniladas adsorbidas sobre intercambiadores aniónicos (DEAE y PEI) en concentraciones crecientes de NaCl.....	70
<b>Figura 7.</b>	Inactivación térmica de diferentes derivados de PGA succinilada. PGA-succ-.....	71
<b>Figura 8.</b>	Estabilidad en 65% de dioxano (v/v) de diferentes derivados de PGA succinilada.....	72
<b>Figura 9.</b>	Estabilidad térmica (A) y en disolventes (B) de distintos derivados de PGA succinilada asdorbida sobre agarosa PEI y entrecruzada con glutaraldehído 0.5%.....	74
<b>Figura 10.</b>	Efecto de la aminación de la PGA en la actividad catalítica en la enzima soluble y en la inmovilizada sobre glioxil agarosa.....	76
<b>Figura 11.</b>	Curso de inactivación térmica de PGA con distintos grados de aminación.....	76
<b>Figura 12.</b>	Cinética de inmovilización de la PGA sobre agarosa-glioxil a pH 9.0.....	77
<b>Figura 13.</b>	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los derivados glioxil PGA-nativa y PGA aminada.....	78

<b>Figura 14.</b>	Efecto del pH sobre la estabilidad térmica de los derivados glioxil-PGA nativa, glioxil-PGA-amino-100 y glioxil-PGA-amino-50. ....	79
<b>Figura 15.</b>	Estabilidad en 60% de dimetilformamida (DMF) (v/v) de los distintos derivados de agarosa glioxil-PGA aminada. ....	79
<b>Figura 16.</b>	Curso de inactivación térmica de los derivados de glioxil-PGA-amino-50 inmovilizados a distintos valores de pH.....	80
<b>Figura 17.</b>	Estudio de la fuerza de unión de la PGA nativa y aminadas adsorbidas sobre intercambiadores catiónicos (CMA y DSA). ....	82
<b>Figura 18.</b>	Estabilidad térmica (A) y frente a disolvente (B) de los derivados de PGA-amino-50.....	83
<b>Figura 19.</b>	Efecto del dioxano en la actividad de los diferentes derivados de PGA. ....	84
<b>Figura 20.</b>	Estructura de los aminoácidos mutados en el mutante PGA 8 glu.	86
<b>Figura 21.</b>	Estructura tridimensional de la PGA mutada que presenta los nuevos 8 glutámicos.....	87
<b>Figura 22.</b>	Superposición de los modelos tridimensionales de la PGA nativa y la PGA 8glu.....	87
<b>Figura 23.</b>	Purificación (A) y determinación del pI(B) del mutante PGA 8glu.....	89
<b>Figura 24.</b>	Representación en Grasp del cambio de potencial electrostático al aumentar el número de glutámicos en la superficie de la PGA de <i>E.coli</i> .....	89
<b>Figura 25.</b>	A.Curso de inactivación térmica a 55°C en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0. ....	91
<b>Figura 25.</b>	B.Curva de actividad-pH utilizando.....	91
<b>Figura 26.</b>	Inmovilización (A) y desorción (B) de PGA nativa y PGA 8glu sobre intercambiadores aniónicos.....	92
<b>Figura 27.</b>	Estudio de envejecimiento de los derivados de PGA8glu.....	93
<b>Figura 28.</b>	Estabilidad en 60% de dioxano (v/v) de derivados adsorbidos dePGA8glu. ....	93
<b>Figura 29.</b>	Inmovilización a pH 5.0 de PGA8glu sobre intercambiadores aniónicos en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. ....	94
<b>Figura 30.</b>	Desorción de la PGA 8glu adsorbida sobre agarosa PEI 600kDa en distintas condiciones de inmovilización.....	95

<b>Figura 31.</b>	Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) de los derivados de PGA 8glu.....	95
<b>Figura 32.</b>	Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) de PGA nativa y PGA 8glu inmovilizadas sobre agarosa glioxil.....	96
<b>Figura 33.</b>	Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) del derivado agarosa glioxil-PGA 8glu recubierto con PEI 600 kDa...	97
<b>Figura 34.</b>	Curso de estabilidad frente a disolvente de los derivados glioxil-agarosa PGA 8 glu coinmovilizado con PEI.....	98
<b>Figura 35.</b>	Curso de estabilidad frente a codisolvente de los derivados de PGA 8glu obtenidos mediante distintos protocolos.....	99
<b>Figura 36.</b>	Estructura de los aminoácidos seleccionados para obtener los mutantes de PGA enriquecidos en aminoácidos nucleofílicos.....	100
<b>Figura 37.</b>	Distintas perspectivas de la superficie de la PGA.....	102
<b>Figura 38.</b>	Representación en Grasp de los aminoácidos seleccionado.....	103
<b>Figura 39.</b>	Representación en Grasp de los aminoácidos seleccionados en la zona posterior de la PGA para ser mutados.....	104
<b>Figura 40.</b>	Purificación de PGAcysB107 y PGAsup (A) y PGApóst (B).....	104
<b>Figura 41.</b>	Determinación del punto isoeléctrico (pI) de PGA sup y PGApóst.....	107
<b>Figura 42.</b>	Estabilidad térmica y perfil actividad-pH de PGAsup PGAcysB107, PGApóst y PGAB276.....	107
<b>Figura 43.</b>	Cinética de inmovilización de los mutantes enriquecidos en nucleófilos sobre soportes Eupergit.....	108
<b>Figura 44.</b>	Curso de inactivación térmica de los derivados Eupergit-PGAsup. (A) y Eupergit-PGApóst (B).....	109
<b>Figura 45.</b>	Curso de estabilidad frente a disolvente de los derivados de Eupergit-PGAsup y Eupergi PGApóst.....	110
<b>Figura 46.</b>	Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante obtenido tras hervir los derivados de PGAsup sobre Eupergit-Tiol.....	111
<b>Figura 47.</b>	Estabilidad en 70% (v/v) de dioxano de los derivados Eupergit-Tiol-PGA sup (A) y Eupergit-tiol- PGA post (B).....	113
<b>Figura 48.</b>	Estabilidad en 70% (v/v) de dioxano de los derivados agarosa glioxil-PGA sup.....	114

<b>Figura 49.</b>	Curso de inmovilización sobre carboximetil agarosa CMA y dextransulfato agarosa (DSA) de PGA nativa y PGAsup y PGApst.....	115
<b>Figura 50.</b>	Representación tridimensional en grasp del mutante PGAB437...	116
<b>Figura 51.</b>	Inmovilización de PGAB437 sobre intercambiadores catiónicos (CMA y DSA) a pH.....	116
<b>Figura 52.</b>	Estudio de la fuerza de unión de la PGA nativa y PGA B437 adsorbidas sobre CMA (A) y DSA (B).....	117
<b>Figura 53.</b>	Estabilidad en 60% (v/v) de dioxano de los derivados CMA-PGAB437 y DSA-PGA437.....	118
<b>Figura 54</b>	Estabilidad en 60% (v/v) de dioxano de los derivados ACM-PGAB437 y ADS-PGA437 adsorbida sobre distintos intercambiadores catiónicos.	118

## DISCUSIÓN

<b>Figura 1.</b>	Disminución de concentración efectiva de disolvente en el entorno de la enzima.....	121
<b>Figura 2.</b>	Mecanismo de inmovilización a distintos valores de pH de la enzima aminada con EDA.....	124
<b>Figura 3.</b>	Comparación entre el diseño racional y la evolución dirigida de proteínas. ....	128
<b>Figura 4.</b>	PEI adsorbida o coinmovilizada sobre el derivado agarosa glioxil PGA 8glu.....	133
<b>Figura 5.</b>	Núcleos de desdoblamiento de la proteína.....	135
<b>Figura 6.</b>	Interacción con una superficie plana (agarosa glioxil) o interacción con soporte tipo fibra (Eupergit).....	139

---

**ÍNDICE DE TABLAS**
**INTRODUCCIÓN**

<b>Tabla 1.</b>	Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de la PGA de <i>E.coli</i> expuestos al medio.....	17
-----------------	---	----

**MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Tabla 1.</b>	Reactivos utilizados. El resto de reactivos y solventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico.....	36
<b>Tabla 2.</b>	Cepas bacterianas utilizadas.....	37
<b>Tabla 3.</b>	Plasmidos utilizados en este trabajo.....	38
<b>Tabla 4.</b>	Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida.....	39
<b>Tabla 5.</b>	Fragmentos obtenidos en cada ronda de PCR y los cebadores empleados de la Tabla 3.....	53

**RESULTADOS**

<b>Tabla 1.</b>	Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de la PGA de <i>E.coli</i> expuestos al medio.....	67
<b>Tabla 2.</b>	Inmovilización de PGA aminada sobre carboximetilagarosa (CMA) y dextransulfato agarosa (DSA).....	81
<b>Tabla 3.</b>	Purificación del mutante PGA 8glu y PGA nativa.....	88
<b>Tabla 4.</b>	Inmovilización de PGA8glu sobre soportes tipo agarosa recubiertos con PEI de distinto tamaño.....	98
<b>Tabla 5.</b>	Purificación del mutante cys B107, PGAsup, PGAcys 278 y PGApst.....	106
<b>Tabla 6.</b>	Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre Eupergit.....	110
<b>Tabla 7.</b>	Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre soporte bifuncional Eupergit-Tiol.....	112
<b>Tabla 8.</b>	Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre agarosa-glioxil 10BCL.....	115

**DISCUSIÓN**

<b>Tabla 1.</b>	Mutaciones puntuales aceptadas frecuentes.....	129
-----------------	--	-----

# ABREVIATURAS

---

---



## ABREVIATURAS

<b>2-PDS</b>	2,2'-dipiridisulfuro
<b>6-APA</b>	Ácido 6-amino penicilánico
<b>BrCN</b>	Bromuro de cianógeno
<b>CM-agarosa</b>	Carboximetil-agarosa
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DS</b>	Dextrano sulfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDA</b>	Etilendiamina
<b>EDAC</b>	1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida
<b>FNR</b>	Ferredoxin-NAPD <sup>+</sup> -reductasa
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactósido
<b>NIPAB</b>	Ácido-nitro-3-(fenilaceto-amido)benzoico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEI-agarosa</b>	Polietilenimina-agarosa
<b>PGA</b>	Penicilina G acilasa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida condiciones desnaturalizantes
<b>SPDP</b>	N-(succintimidyl-3-82-piridilditio)propionato
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UI</b>	Unidad internacional de actividad enzimática

# ABSTRACT

---

---

Nowadays, processes catalyzed by enzymes are more abundant compared to traditional chemical methods because of the advantages they present. Enzymes show great selectivity and specificity working under mild conditions, but in order to be used as biocatalysts under industrial situations must be improved. Enzyme immobilization has been proven to be a strong tool for enzyme implementation on an industrial scale. In this work, chemical modification or site-directed mutagenesis have been used to modify the surface of penicillin G acylase (PGA) from *E. coli*. The aim of these modifications will not be to directly improve the enzyme properties but to enhance the prospects of improving the enzyme properties via a better immobilization.

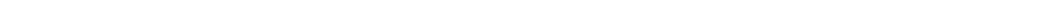
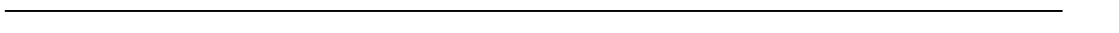
Chemical amination of the protein surface is used to increase the possibilities of achieving an intense multipoint covalent attachment on glyoxyl support. The stabilization factor has been increased by a 150-fold compared to the immobilization of the non modified enzyme on similar support.

Chemical amination of the protein surface has also allowed to increase the adsorption strength of the proteins to supports coated with dextran sulphate for its reversible immobilization. Native enzyme hardly was adsorbed on this type of supports, while the aminated enzyme was strongly adsorbed. Nevertheless, after enzyme inactivation, the enzyme can be desorbed using drastic conditions and the support may be reused. The adsorption of the enzyme on this hydrophilic polymer permitted to increase its stability on organic media by a 10-15 fold factor compared to covalent preparations.

By chemically succinylating the enzyme surface or raising the glutamic content, the PGA has increased its adsorption strength on supports coated with polyethyleneimine (PEI). The non modified enzyme can hardly adsorb on these supports, and this adsorption of the modified/mutant enzyme on this hydrophilic polymer permits its stabilization in the presence of organic medium.

Increasing by site-directed mutagenesis the number of glutamic residues on the enzyme surface has allowed the development of new enzyme derivatives when coimmobilization with PEI on glyoxyl agarose support is performed. Native enzyme did not interact with PEI, therefore it was not able to fully cover the native PGA while mutant enzyme was able to interact. The polymer protected the entire enzyme surface and increased its stability against organic cosolvents by generating a hyperhydrophilic environment surrounding the protein.

# INTRODUCCIÓN



## 1. LA BIOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO DE NUEVOS PROCESOS SOSTENIBLES.

En la actualidad, la mayor parte de nuestra energía proviene de la combustión de recursos fósiles, siendo necesario encontrar nuevas formas de energía sostenible y explotar nuevos recursos. La aplicación y el desarrollo continuado de la biotecnología reducirán nuestra dependencia de los combustibles fósiles al poder ser reemplazados por fuentes renovables como la biomasa (Soetaert y Vandamme, 2006).

La **biotecnología industrial o blanca** ha sido aceptada como una tecnología clave para el desarrollo de una industria química sostenible (Paula y Birrer, 2006; Glaser, 2005). Entre los productos que se pueden obtener podemos encontrar productos farmacéuticos, biocolorantes, bioplásticos, vitaminas, aditivos alimentarios, biopesticidas y biocombustibles como bioetanol y biodiesel (Poincet y Parris, 2004). Actualmente, los procesos biotecnológicos representan un 5% en la industria química pero se espera un incremento del 10-20% para el año 2010 (Bachmann, 2003).

La biotecnología industrial comprende campos que van desde la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas hasta la ingeniería metabólica. Otras disciplinas como la ingeniería bioquímica y de bioprocesos son también necesarias para la obtención de productos biotecnológicos (Soetaert y Vandamme, 2006).

Los procesos basados en **biocatalizadores** (enzimas, ribozimas, células) juegan un papel esencial en este contexto. Los biocatalizadores operan a temperaturas más bajas, producen menos residuos tóxicos, menos emisiones y productos secundarios (*by-pass products*) comparados con los procesos de catálisis química convencional, reduciendo así la demanda energética y el impacto medioambiental.

### 1.1 Búsqueda del biocatalizador “ideal”. Tecnología enzimática.

Las **enzimas** son los biocatalizadores por excelencia. Actuando en secuencias organizadas, catalizan cientos de reacciones en las rutas metabólicas de los seres vivos bajo condiciones óptimas. Poseen propiedades que convierten los procesos enzimáticos en excelentes competidores de los catalizadores químicos tradicionales:

1. *Gran eficiencia catalítica (k<sub>cat</sub>)*. Teniendo en cuenta que el principal objetivo de cualquier proceso de biotransformación es obtener una elevada conversión del

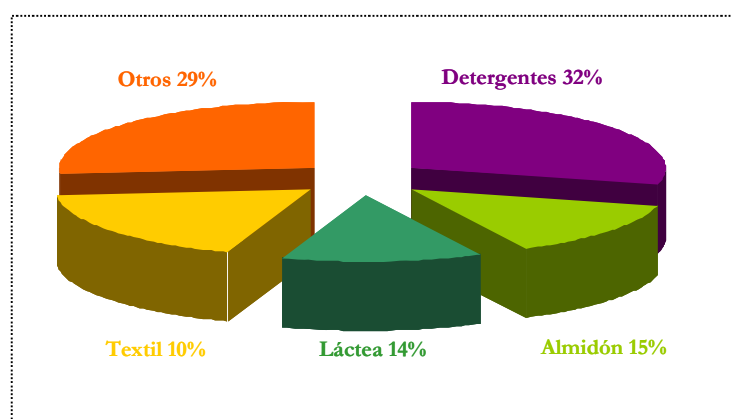
sustrato en producto en el mínimo tiempo posible, el número de recambio y la estabilidad de la enzima juegan un papel importante.

2. *Elevada especificidad y selectividad (químico-, regio- y enantioselectividad)* dependiendo de su papel metabólico.
3. *Actúan bajo condiciones suaves de reacción (presión, temperatura y pH).*
4. *Aceptabilidad medioambiental*, ya que al ser compuestos biológicos se degradan completamente en el medio.

En la actualidad se conocen más de 2000 enzimas pero, a pesar de las excelentes propiedades catalíticas que presentan, se explotan solamente unas 400 (**Figura 1**) y en su mayoría se trata de enzimas extracelulares y de origen microbiano.

Esto es debido a que las enzimas se han optimizado a lo largo de la evolución en función de su papel fisiológico y no en función de las necesidades de la industria. Por ello, muchas enzimas no son suficientemente estables bajo las condiciones de reacción deseadas; la agitación mecánica, los disolventes, las altas temperaturas, pH extremos, la necesidad de cofactores así como su inhibición por elevadas concentraciones de sustratos y productos, provocan la pérdida de su actividad y selectividad óptimas (Klibanov, 1983b).

La **tecnología enzimática** tiene como objetivo lograr superar todos aquellos inconvenientes que impidan la aplicación de las enzimas en los procesos industriales. Como se ha mencionado, uno de los principales de estos inconvenientes es su falta de estabilidad. Esto puede resolverse por medio de la **inmovilización** de la enzima como paso previo a su aplicación industrial.



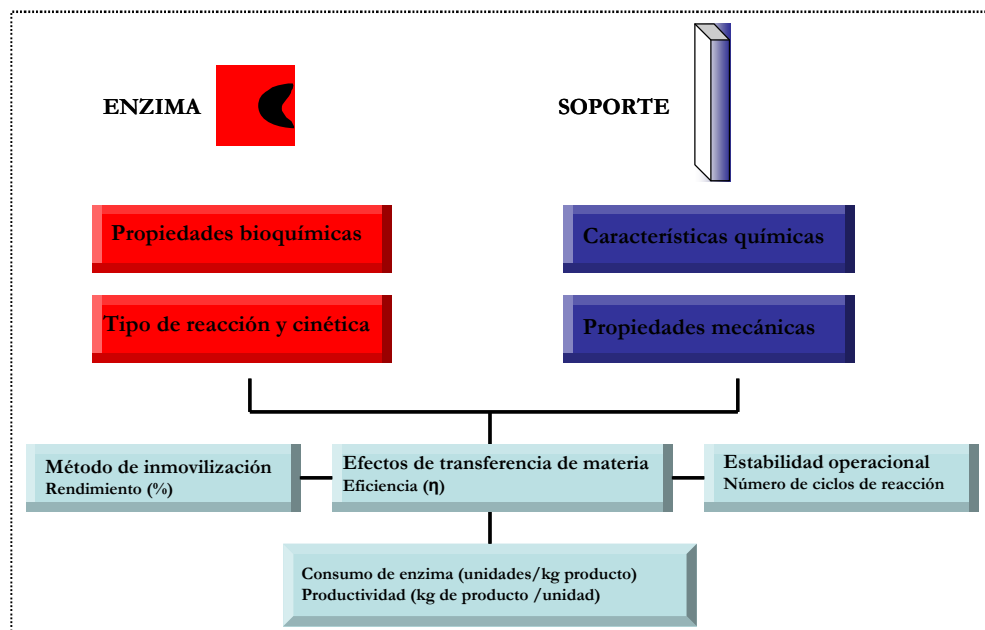
**Figura 1.** Principales aplicaciones industriales de las enzimas.

## 2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

Cuando una enzima tiene interés industrial para una determinada reacción, su aplicación está normalmente limitada por la falta de una estabilidad operacional en las condiciones del proceso y también por la dificultad de recuperar y reciclar el biocatalizador.

Una vez el catalizador está **inmovilizado**, [físicamente confinado o localizado en una región definida del espacio con retención de su actividad catalítica, (Katchalski-Katzir, 1993)] pasa de ser un catalizador soluble a presentar las siguientes ventajas como catalizador heterogéneo:

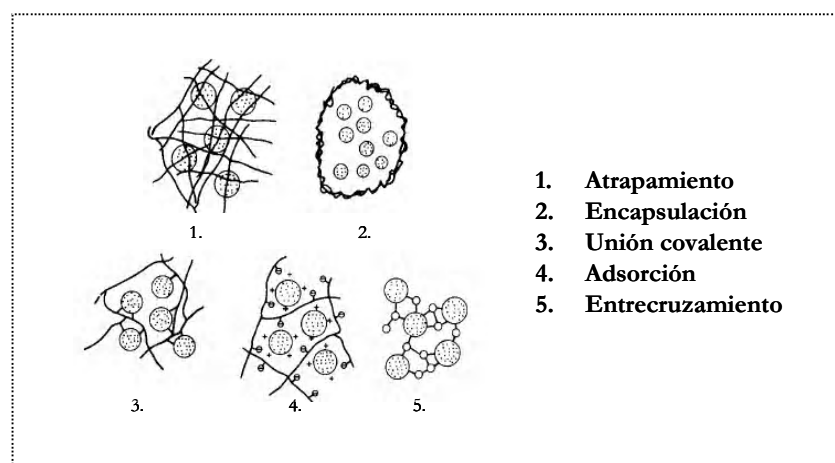
1. Reutilización o uso continuado.
2. Fácil separación de la mezcla de reacción.
3. Posibilidad de modular las propiedades catalíticas.
4. Prevención de la contaminación del producto con proteínas.
5. Prevención de una contaminación microbiana.
6. Posible estabilización de la estructura tridimensional de la enzima.



**Figura 2.** Propiedades de la enzima inmovilizada. Éstas vienen determinadas por una combinación de las propiedades de la enzima y del soporte. (Tischer y Kasche, 1999).

Las propiedades de los derivados enzimáticos (enzima inmovilizada) vienen determinadas tanto por las características de la enzima como por las del soporte sobre el que se inmoviliza. La interacción entre ambos dará lugar a un derivado enzimático con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas específicas (**Figura 2**) (Tischer y Kasche, 1999). Como para otros procesos físicos o químicos, tanto la velocidad como el rendimiento de la inmovilización vienen determinados por distintos parámetros entre los que se encuentran: el tipo de soporte, el método elegido de inmovilización, la concentración de enzima y de grupos reactivos en el soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Buchholz, 1979).

Los distintos métodos de inmovilización se clasifican a menudo según el tipo de interacción físico-química usada en la unión entre el soporte y la enzima (**Figura 3**). La adsorción sobre soportes iónicos y la inmovilización covalente son, de las técnicas de inmovilización disponibles, las que están presentes en un mayor número de aplicaciones en la industria. (Buchholz *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Métodos de inmovilización

## 2.1 Inmovilización por enlace covalente. Características.

Este método de inmovilización supone la unión irreversible entre enzima y soporte. Los enlaces que se forman son fuertes y estables, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción (Faber, 1996; Leckband y Langer, 1991). Para obtener un elevado rendimiento de inmovilización, es importante que los aminoácidos esenciales para la catálisis no estén involucrados en la unión covalente. Este hecho conduce al reciente



interés en lograr la inmovilización orientada de enzimas y de moléculas para lograr que retengan su actividad catalítica o biológica (Grazú, 2006; Luk *et al.*, 2004; Madoz-Gúrpide *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2002; Wilchek y Miron, 2003).

La unión covalente se lleva a cabo normalmente entre grupos funcionales presentes en el soporte y las cadenas laterales de los aminoácidos accesibles en la superficie proteica (grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas, SH de las cisteínas, OH de tirosinas y serinas, COOH de aspárticos y glutámicos) dando lugar a distintos tipos de enlaces (amida, éter, tio-éter o enlaces carbamatos) (Srere y Uyeda, 1976). Se logra de esta manera que la enzima quede irreversiblemente unida al soporte pero, como inconveniente, una vez que la actividad enzimática disminuye o desaparece, el derivado completo deberá ser desechado.

La unión covalente a soportes ha permitido en numerosas ocasiones modificar las propiedades de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima soluble, tales como mejorar su eficiencia catalítica (aumento de K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) (Clark y Bailey, 1983; Katchalski-Katzir, 1993; Tischer y Kasche, 1999) o mejorar su estabilidad frente a agentes distorsionantes (Bickerstaff, 1997; Fernández-Lafuente *et al.*, 1999a; Guisán *et al.*, 1993).

### **2.1.1 Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos aldehído (agarosa glioxil).**

Cuando la enzima se encuentra unida al soporte por más de un residuo, la posición relativa de los mismos permanece inalterada durante los posibles cambios conformacionales causados por cualquier agente distorsionante (calor, pH, disolventes orgánicos, etc). De esta manera, la estabilidad de una enzima unida de forma covalente multipuntual al soporte es, por lo general, mayor que la de la enzima soluble y mayor que la de la enzima unida al soporte por un solo residuo (unión unipuntual) (Gupta, 1991; Klibanov, 1983d; Martinek *et al.*, 1977; Mateo *et al.*, 2005)

Esta interacción múltiple es un proceso complejo que implica la elección de un sistema adecuado de inmovilización-estabilización de la enzima, sin provocar grandes distorsiones en su estructura.

El soporte agarosa glioxil (agarosa activada con una monocapa de grupos aldehído) presenta características ideales para lograr esta unión multipuntual intensa (Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2006a). Entre ellas se pueden destacar:

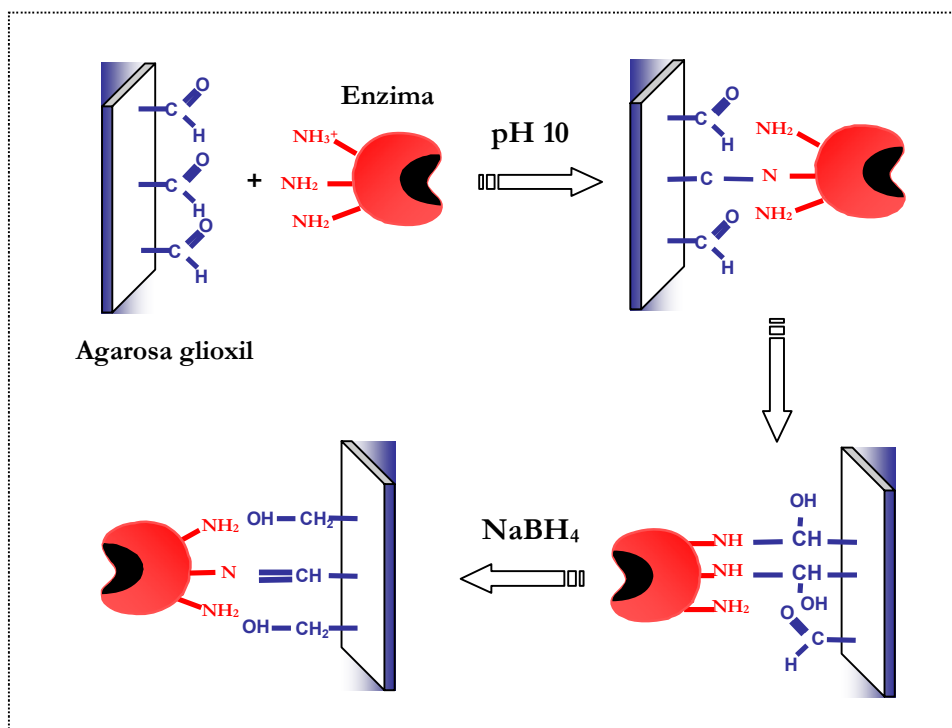
- Buena congruencia geométrica entre la superficie del soporte y la proteína para favorecer esta interacción múltiple.
- Elevada reactividad de los grupos glioxil del soporte con los grupos amino primarios no ionizados de la proteína.
- Impedimentos estéricos mínimos en la reacción de los grupos amino de la proteína y el soporte.
- El soporte está activado con brazos espaciadores cortos, lo cual confiere a la enzima inmovilizada mayor rigidez y así una mayor estabilidad.
- Fácil control del grado de activación del soporte pudiendo lograr una elevada densidad de carga por superficie del soporte.

#### *Mecanismo de inmovilización.*

Sobre los soportes agarosa glioxil, la inmovilización tiene lugar a través de las zona/s de la superficie de la enzima con mayor densidad de grupos amino primarios y no a través del grupo amino más reactivo como ocurre en la mayoría de las otras técnicas de inmovilización (Mateo *et al.*, 2006a).

Se hacen reaccionar los grupos amino primario de la proteína con soportes agarosa activados previamente de forma que en la superficie presenten una monocapa de aldehídos ligeramente alejados de la pared del soporte y totalmente expuestos al medio (Guisán, 1988).

En un primer paso (**Figura 4**), se da la formación de enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre los  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas y los grupos aldehídos del soporte. Las lisinas son normalmente aminoácidos abundantes en la superficie proteica, expuestas al medio y, cuando están desprotonadas, son muy reactivas como nucleófilos por lo que es necesario realizar la reacción a un pH que esté por encima del pK<sub>a</sub> de los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (pH 10.05). Esta primera interacción entre la enzima y el soporte se produce, al menos, a través de dos puntos por lo que la enzima se debe auto-orientar hacia el soporte en su zona/s más rica/s en grupos amino reactivos (Mateo *et al.*, 2006a). Esto da lugar a una unión débil y reversible.



**Figura 4.** Inmovilización covalente multipuntual sobre soportes agarosa glioxil.

En un segundo paso, se reducen las bases de Schiff a enlaces amino secundario con borohidruro de sodio. Esta reducción permite, además de estabilizar el enlace enzima-soporte, convertir todos los grupos aldehído remanentes en grupos hidroxilo dando lugar a una matriz inerte e hidrofílica (Blanco y Guisán, 1989). Si no se realiza un bloqueo de los grupos reactivos, podrían ocurrir un número de reacciones indeseadas o no controlada que desestabilicen la proteína, llegando a inactivarla (Mateo *et al.*, 2002).

Con un elevado número de enzimas se ha logrado obtener altos factores de estabilización al unirlos a este soporte. La actividad enzimática recuperada varía de un 60 a un 100% mientras que las estabilizaciones en la mayoría de los casos superan factores de  $10^3$  llegando, incluso, a  $10^5$  (Alvaro *et al.*, 1990; Bes *et al.*, 1995; Fernández-Lafuente *et al.*, 1995a; Ichikawa *et al.*, 2002; Mateo *et al.*, 2005; Suh *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos epóxido.

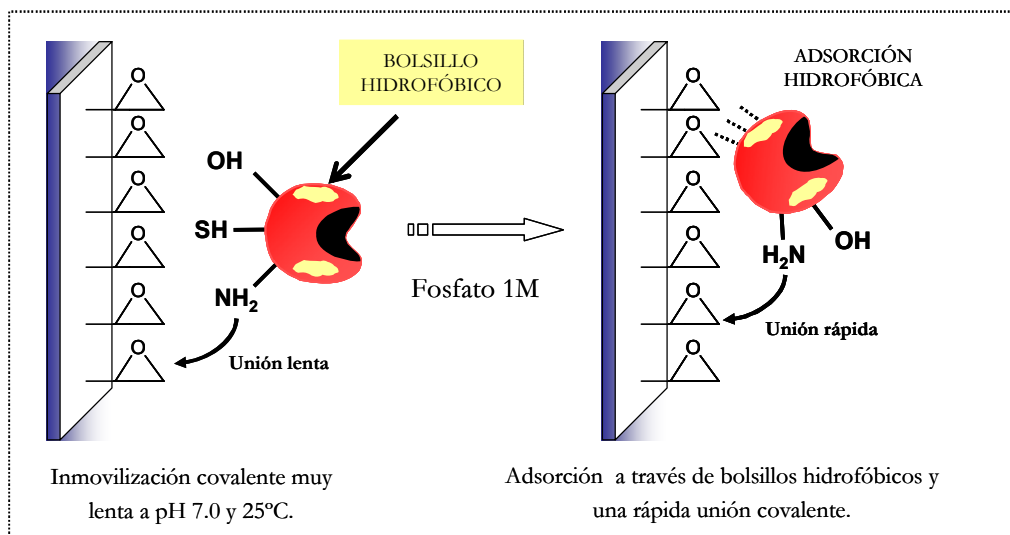
Otra técnica que ha sido comúnmente explotada con éxito tanto a escala de laboratorio como industrial es la unión de proteínas a grupos epóxido del soporte (Katchalski-Katzir, 1993; Mateo *et al.*, 2000a; Wheatley y Schmidt Jr, 1999). Los grupos epóxidos son muy estables a valores de pH neutro, incluso en condiciones de humedad pueden ser almacenados por largos períodos de tiempo. Estos soportes permiten estabilizar enzimas a través de enlace covalente multipuntual mediante el control de la interacción entre la enzima y los grupos reactivos del soporte (Mateo *et al.*, 2000a). Varias enzimas se han logrado implementar tanto a escala de laboratorio como industrial mediante este tipo de inmovilización (Boller *et al.*, 2002; Chikere *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2002; Petzelbauer *et al.*, 2002; Torres-Bacete *et al.*, 2000).

Los soportes epóxidos son capaces de reaccionar con varios grupos nucleófilos de la proteína (amino, sulfidrido, hidroxilo) para formar enlaces covalentes irreversibles (enlaces amino secundario, tio-éteres y éteres) con una mínima modificación química de la proteína; por ejemplo, en el caso de la formación de enlaces amida, los valores de pK de los nuevos grupos amino secundarios son muy similares a los de los grupos amino primario antes de la inmovilización (Faber, 1996; Hartmeier, 1985).

Los grupos epóxidos de los soportes comerciales con grupos epóxido (Eupergit, Sepabeads) son reactivos para la inmovilización enzimática bajo condiciones experimentales suaves (Grazú *et al.*, 2003; Melander *et al.*, 1984). El problema que presentan estos grupos es su baja reactividad por lo que la inmovilización transcurre lentamente (puede llevar desde horas hasta días) y con bajos rendimientos de inmovilización.

#### *Mecanismo de inmovilización.*

El mecanismo de inmovilización tradicional sobre estos soportes se muestra en la **Figura 5**. En una primera etapa se promueve una adsorción hidrofóbica de la proteína al soporte (Mateo *et al.*, 2000a; Wheatley y Schmidt Jr, 1999). La mayoría de los soportes comerciales diseñados para la inmovilización de proteínas posee una naturaleza hidrofóbica, y se requiere el uso de condiciones de alta fuerza iónica para forzar la adsorción. En una segunda etapa, la proteína que ha sido previamente adsorbida se une de forma covalente a través de los grupos nucleófilos de la proteína (amino, sulfidrido, etc.) a los grupos epóxidos del soporte. La proximidad entre los grupos epóxidos de la superficie

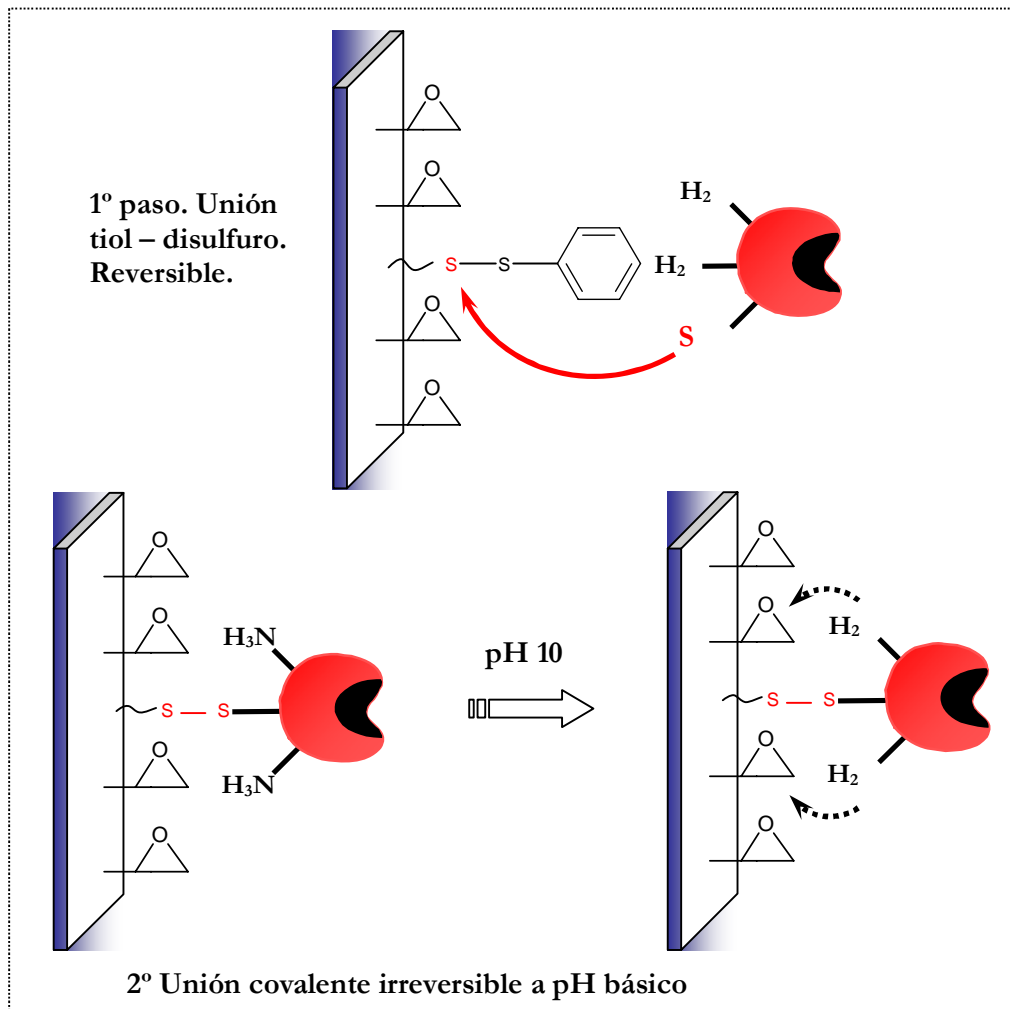


**Figura 5.** Mecanismo de inmovilización tradicional sobre resinas epoxiacrílicas.

del soporte y los grupos nucleofílicos de la superficie de la proteína se traduce en un aumento de su concentración efectiva, lo que favorece la formación del enlace covalente.

Se han desarrollado distintos soportes donde se han derivatizado un porcentaje de los grupos epóxidos a otros grupos funcionales con el fin de sustituir esa primera adsorción física hidrofóbica que ralentiza el proceso de inmovilización. Se han obtenido así soportes epóxido heterofuncionales con grupos amino, borato, carboxilo o quelatos metálicos (López-Gallego *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003) que facilitan esa primera adsorción sin necesidad de emplear alta fuerza iónica.

También se han diseñado soportes tiol-époxido (**Figura 6**) en los que se ha sustituido un pequeño número de grupos epóxido por grupos tiol reactivos (Grazú *et al.*, 2003). En este caso la primera etapa de inmovilización no estaría promovida por tipo alguno de adsorción sino que tendría lugar un enlace covalente reversible disulfuro entre los grupos tiol de la proteína y los grupos tiol reactivos del soporte. La segunda etapa de inmovilización sería similar a la mencionada anteriormente para el resto de soportes epóxido, dando lugar a enlaces irreversibles con los grupos nucleofílicos próximos, lisinas principalmente.



**Figura 6.** Mecanismo de inmovilización sobre soportes heterofuncionales tiol-epóxido.

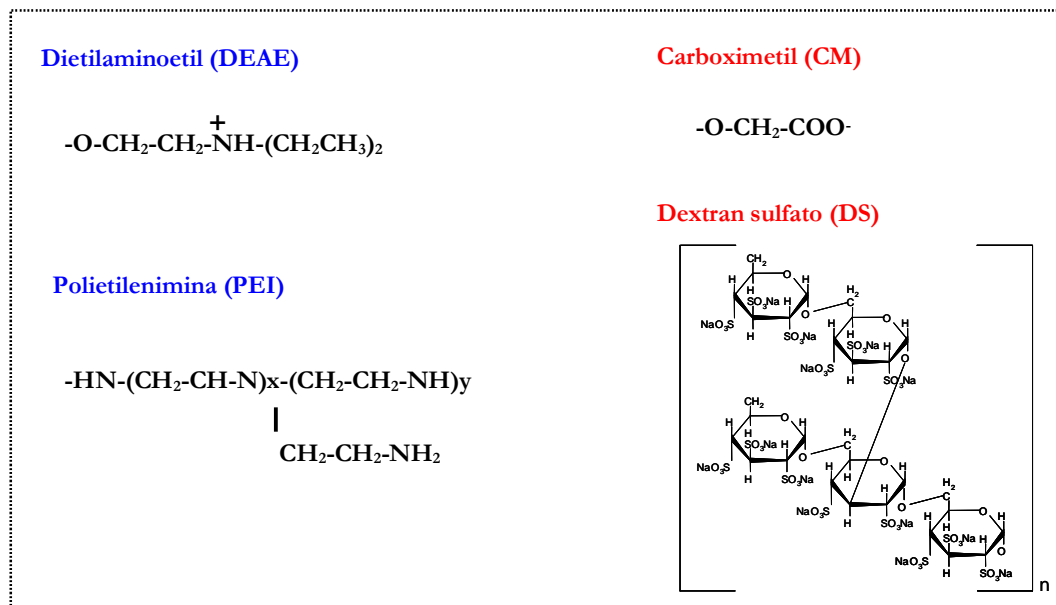
## 2.2 Inmovilización reversible por adsorción iónica.

Las fuerzas que intervienen en adsorción iónica de la proteína al soporte son en su mayoría de tipo electrostático (interacciones iónicas y puentes de hidrógeno) y aunque estas fuerzas son débiles, si abundan, son suficientes para generar una unión estable entre la enzima y el soporte. Los protocolos de inmovilización son generalmente simples; basta poner en contacto la enzima con el soporte bajo condiciones suaves de reacción (baja fuerza iónica).

La inmovilización reversible sobre soportes puede ser un protocolo conveniente para algunas enzimas industriales; de hecho, fue la primera estrategia para obtener un biocatalizador industrial (Chibata y Tosa, 1976; Katchalski-Katzir, 1993). La reversibilidad de un derivado implica la posibilidad de obtener la completa desorción de la enzima del soporte con una fuerza iónica alta, cuando la actividad del catalizador no es rentable. El soporte puede recuperarse libre de proteína y utilizarse de nuevo para una posterior inmovilización con enzima fresca. Así el soporte puede ser reutilizado, en principio de forma indefinida, y el único residuo generado es la solución de enzima inactivada y la sal. (Brena *et al.*, 1994; Klibanov, 1983c; Mateo *et al.*, 2000b; Nahalka y Gemeiner, 2006; Ovsejevi *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 2001). Estos métodos de inmovilización serían muy útiles en los procesos industriales en los que el coste del soporte represente un valor importante dentro del coste global del biocatalizador. Por ejemplo, el soporte DEAE celulosa ha sido empleado a escala industrial para la inmovilización de la glucosa isomerasa (Antrim y Auterinen, 1986). Con este derivado enzimático se logran obtener entre 10-15 t de producto de sirope por Kg de biocatalizador. Una vez la enzima se inactiva, el soporte se regenera añadiendo nueva enzima.

Tradicionalmente se han utilizado estos métodos para procesos de purificación de enzimas y no para inmovilización, debido a la dificultad que conlleva mantener la proteína adsorbida sobre el soporte en las condiciones de reacción deseadas (Chen *et al.*, 2003; Lyddiatt, 2002; Rao, 2001; Weaver Jr y Carta, 1996). Variaciones de pH, presencia de sustratos o productos ionizables, el empleo de altas temperaturas para solubizar reactivos pueden acelerar la desorción de la enzima (Kennedy *et al.*, 1990; Rosevear, 1984; Royer, 1980).

Para extender el uso de enzimas adsorbidas a soportes iónicos como biocatalizadores de uso industrial sería necesario el desarrollo de matrices flexibles de gran superficie y con una alta densidad de residuos iónicos que interaccionasen con la superficie enzimática. Esto permitiría una unión más fuerte que la alcanzada sobre matrices rígidas convencionales de adsorción iónica tipo agarosa dietilaminoetil (DEAE) o agarosa carboximetil (CM).



**Figura 7.** Estructura de los grupos funcionales en los intercambiadores iónicos agarosa DEAE, agarosa-CM, agarosa-PEI y agarosa-DS.

### 2.2.1 Inmovilización reversible sobre soportes poliméricos iónicos.

Se han propuesto varios métodos para inmovilizar las enzimas de forma reversible, fuerte y a su vez que su estructura tridimensional no se distorsione. Estos sistemas están basados en la adsorción sobre soportes porosos rígidos (i.e. agarosa, sephabeads) revestidos con polímeros iónicos flexibles que contienen una alta densidad de grupos cargados para el intercambio iónico (Fuentes *et al.*, 2004a; Mateo *et al.*, 2000b; Torres *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2004). La fuerza de unión a estos soportes es mayor que la encontrada en los soportes convencionales de intercambio iónico, lo cual evita la desorción de la enzima al medio en condiciones de reacción donde sí habría desorción de la enzima en los soportes convencionales. Una vez la enzima se inactive o el biocatalizador no sea rentable se puede someter a condiciones drásticas (1 M NaOH, >1 M NaCl) para recuperar el soporte polimérico. La inmovilización de proteínas sobre estos soportes recubiertos de polímeros puede tener ventajas adicionales como prevenir la disociación de subunidades en enzimas multiméricas (Arica y Bayramoglu, 2006; González *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2000b) o generar microambientes hidrofílicos que estabilicen la proteína frente a disolventes orgánicos (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999b; Fuentes *et al.*, 2004b; Hwang *et al.*, 2004).



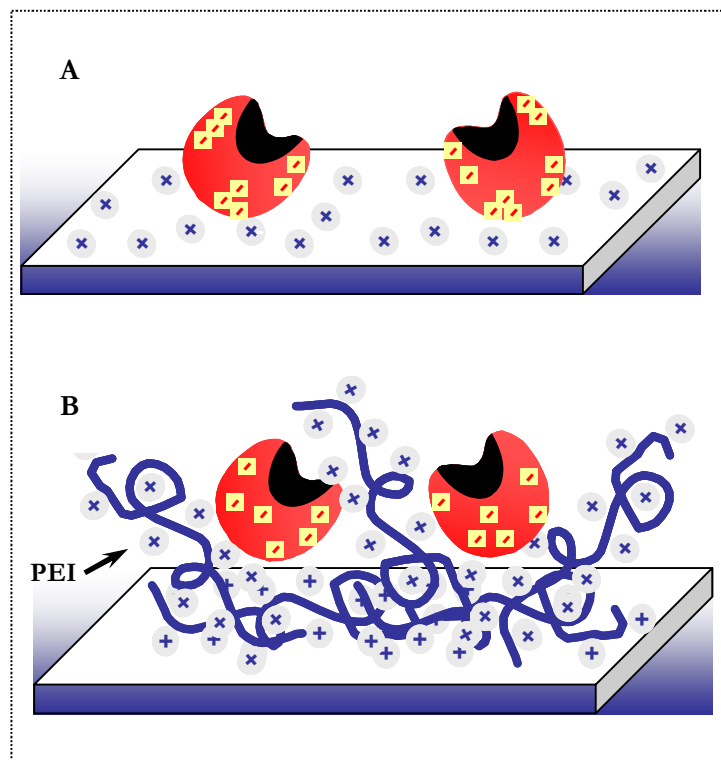
La agarosa recubierta de polietilenimina (PEI) y la agarosa recubierta de dextrano sulfato (DS) son dos ejemplos de soportes de agarosa recubiertos por polímeros iónicos. La polietilenimina (PEI) es una poliamina alifática flexible que contiene una alta densidad de grupos cargados positivamente (Bahulekar *et al.*, 1991). Se ha atribuido a la PEI un efecto estabilizador sobre la estructura terciaria de ciertas proteínas (Andersson y Hatti-Kaul, 1999; Bryjak, 1995). El polímero se hace reaccionar covalentemente con soportes tipo agarosa o sepabeads (Mateo *et al.*, 2000b), dando lugar a un intercambiador aniónico que ha permitido inmovilizar y estabilizar distintas enzimas (Arica y Bayramoglu, 2006; González *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2000b; Torres *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2004).

La agarosa recubierta de dextrano sulfato (DS) (polímero aniónico comercial de distintos tamaños) se obtiene a partir de soportes con un pequeño porcentaje de grupos catiónicos en su superficie (agarosa-MANAE), (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993) que permiten que el polímero dextrano sulfato se adsorba. La carga final del soporte viene determinada por el polímero ya que éste presenta una densidad de cargas mucho mayor que la de la superficie sobre la que se adsorbe. Mediante el recubrimiento con este tipo de moléculas se consigue una alta densidad de carga por volumen de soporte con lo cual las proteínas se adsorberían de manera muy fuerte. Estos soportes, al igual que la agarosa-PEI, son estructuras flexibles que se pueden adaptar a la superficie de la proteína (Fuentes *et al.*, 2004a; Fuentes *et al.*, 2004b).

El carácter tridimensional del soporte permite que una mayor superficie de la proteína entre en contacto con la estructura del polímero iónico permitiendo una interacción más intensa con los grupos ionizables de la enzima. La flexibilidad del polímero permitirá que éste se adapte a la estructura de la proteína en lugar de que sea la proteína la que se acople a una matriz rígida como la agarosa DEAE o la agarosa CM, evitando que la estructura de la proteína se distorsione.

Los soportes convencionales están normalmente activados con una densa capa de grupos cargados de forma positiva o negativa (Baumeister *et al.*, 2003; Iberer *et al.*, 2001). Estas matrices presentan una superficie plana de interacción con la proteína (plano bidimensional) donde tan sólo un 15-20% de la superficie proteica estaría involucrada en la adsorción (Iberer *et al.*, 2001; Pessela *et al.*, 2003). Por lo tanto, si se quiere lograr la inmovilización sobre este tipo de soportes de intercambio iónico, la proteína debe presentar zonas donde la carga superficial esté localizada y sea complementaria a la carga del soporte **(Figura 8A)**.

En el caso de los soportes recubiertos con polímeros iónicos flexibles la interacción que se produce no sería sobre un plano sino que sería sobre un volumen (interacción tridimensional), por lo tanto, no sería necesario que las cargas superficiales estuviesen localizadas en zonas concretas de la superficie, sino que la adsorción tendría lugar a través de toda la superficie con la carga iónica distribuida. **(Figura 8B)**. Se ha descrito que es posible adsorber proteínas en soportes recubiertos con estos polímeros que no pueden ser adsorbidas sobre soportes convencionales (Kumar *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2000b; Torres *et al.*, 2006).



**Figura 8.** A. Adsorción bidimensional sobre soportes convencionales de intercambio iónico (agarosa DEAE) *vs* adsorción tridimensional sobre soportes recubiertos con polímeros iónicos B (agarosa PEI).

### 3. PAPEL DE LA SUPERFICIE ENZIMÁTICA EN LA INMOVILIZACIÓN: INGENIERÍA DE LA SUPERFICIE PROTEICA.

A la hora de mejorar los procesos de inmovilización se debe tener en cuenta tanto el desarrollo de nuevos soportes para la inmovilización como las distintas aproximaciones que conciernen un mayor conocimiento de la estructura de la proteína. Este mayor conocimiento de la estructura enzimática y de su mecanismo permitirá lograr una inmovilización más controlada.

El análisis de unas 125 familias de proteínas reveló que la mayoría (hasta un 95%) de los residuos polares e ionizables están situados en la superficie de las proteínas (Creighton y Freedman, 1993; Gitlin *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 1998). Estos residuos participan en numerosos procesos biológicos como, por ejemplo, la asociación de receptores a ligandos (Gao *et al.*, 1996), la formación de complejos proteína-proteína (Davis *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2003; Lee y Tidor, 2001), proteína-ácido nucleico (Tworowski *et al.*, 2005), plegado y estabilidad de proteínas (Kumar y Nussinov, 2004) o el transporte selectivo de iones a través de proteínas (Jiang *et al.*, 2003).

Las propiedades de la superficie externa de la proteína y los grupos reactivos accesibles juegan un papel fundamental a la hora de su inmovilización en el soporte. Como se ha visto en el apartado anterior, tanto en la inmovilización covalente como en la adsorción iónica los residuos que estén suficientemente expuestos al medio son los que intervendrán en la reacción o interacción con el soporte dando lugar al derivado enzimático.

La adsorción iónica dependerá de las características hidrofílicas e hidrofóbicas de las distintas regiones de la superficie. La interacción de los grupos iónicos dependerá del tipo de aminoácido presente y de su densidad que en consecuencia determinará la carga neta total de la superficie. Esta a su vez estará influenciada por el pH, fuerza iónica y temperatura de la solución (Petersen *et al.*, 1998).

En la inmovilización covalente, distintos grupos funcionales de la superficie proteica se pueden utilizar en el enlace al soporte pero, en la práctica, sólo unos pocos se utilizan (Srere y Uyeda, 1976). Tanto los grupos amino como carboxilo presentan características ideales para su unión a los soportes gracias a su reactividad y densidad en la superficie proteica siempre y cuando no estén involucrados en el centro activo (**Tabla 1**).

Grupo funcional	pKa	Contenido medio (%)
Lisinas-NH <sub>2</sub>	10.5	11
Glutámicos-COO-	3.9	4.8
Aspárticos-COO-	4.1	4.8
Tirosina-OH	10.1	3.4
Triptófano-NH		1.2
Histidina	6.5	2.2
Cisteína-SH	9.5	-

**Tabla 1.** Grupos funcionales de las proteínas más relevantes para la inmovilización.

En la presente Tesis se pretende modificar la superficie de la proteína (*protein surface engineering*) para intentar mejorar y desarrollar nuevas técnicas de inmovilización. La modificación de residuos expuestos al medio nos permitiría lograr un cambio en las propiedades de la superficie proteica sin provocar alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína (Hawrani *et al.*, 1994). Distintas técnicas como la modificación química y la mutagénesis dirigida se emplearán para generar esta modificación de residuos los accesibles.

### 3.1 Modificación química de la superficie enzimática.

La modificación química de proteínas ha sido ampliamente utilizada para alterar las propiedades físicoquímicas y biológicas de las mismas (Davis, 2003; Tann *et al.*, 2001). El objetivo de estas modificaciones ha sido muy diverso; en ocasiones se pretendía alterar su inmunorreactividad o inmunogenicidad (Inada *et al.*, 1986), en otros casos identificar grupos funcionales en la proteína, aumentar su actividad y solubilidad en medios hidrofóbicos (Alcalde *et al.*, 1998; Geoghegan, 1996; Kawase y Tanaka, 1989) o bien aumentar su estabilidad (Lenders y Crichton, 1984; Saidel *et al.*, 1964; Torchilin *et al.*, 1983; Wong y Wong, 1992).

Los residuos expuestos al medio y más reactivos son los que se pueden modificar pero no es posible controlar qué residuos de todos ellos en concreto son los que se alteran (López-Gallego *et al.*, 2005).

Cuando se compara con las técnicas de mutagénesis, la modificación química presenta ciertas ventajas. En primer lugar, no es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína; como la enzima está ya plegada, el proceso de plegamiento no se verá afectado por la modificación. Segundo, permite la introducción de grupos reactivos que pueden presentar propiedades distintas a las de los aminoácidos naturales (Lundblad, 1991), p.e. reactividad mejorada. Como desventajas hay que tener en cuenta que es necesario repetir el proceso de modificación cada vez que se necesite la enzima y muchos reactivos químicos son tóxicos y contaminantes.

### 3.1.1 Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA).

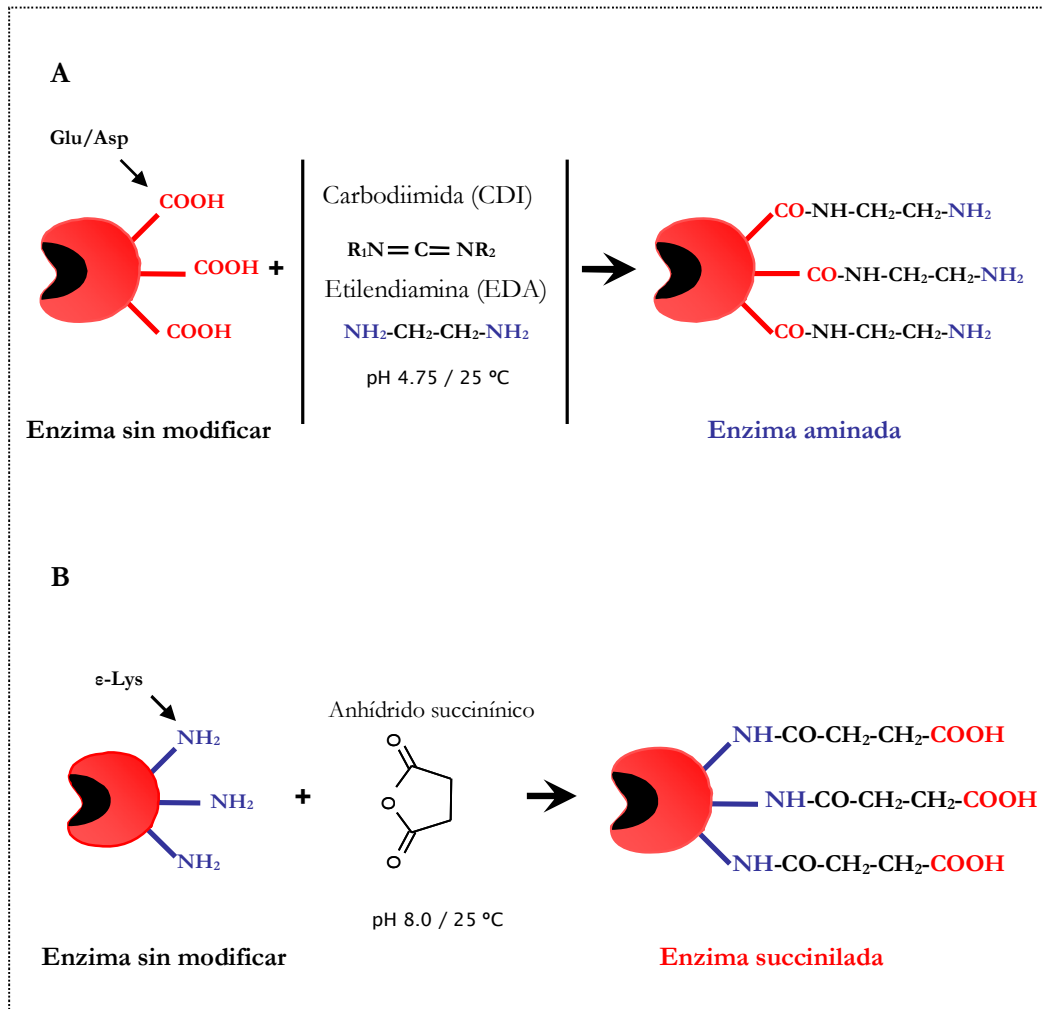
Los grupos carboxilo (glutámicos, aspárticos y carboxilo terminal) de las proteínas pueden ser transformados en aminas primarias mediante la activación de los mismos con una carbodiimida soluble en presencia de un nucleófilo (EDA) (Hoare y Koshland Jr, 1967) (**Figura 9A**). La reacción permite la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo activado de la proteína y uno de los grupos amino de la EDA, dejando un grupo amino primario libre. Este grupo amino primario introducido presenta un valor de pKa entorno a 9.2 (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993) por lo tanto es reactivo a valores de pH menores que el grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas superficiales.

El número de grupos carboxilo superficiales modificados se puede controlar variando la concentración de carbodiimida usada durante la reacción (Fernández-Lafuente *et al.*, 1995b; Hoare y Koshland Jr, 1967).

### 3.1.2 Carboxilación química de grupos amino con anhídrido succínico.

Otra posible modificación es la transformación de los grupos amino (lisinas y amino terminal) con anhídrido succínico dando lugar a una enzima enriquecida en grupos carboxilo (Klotz, 1967). El anhídrido succínico reacciona con los grupos amino originando una enzima modificada como muestra la **Figura 9B**.

Al igual que en el caso de la aminación química con EDA, se puede controlar el grado de modificación de los grupos amino variando la concentración de anhídrido succínico presente en la reacción (Alcalde *et al.*, 1998).



**Figura 9.** Mecanismo de aminación química de grupos carboxilo (A) y carboxilación (B) química de grupos amino. La enzima es modificada mediante etilendiamina y anhídrido succínico respectivamente.

### 3.2 Mutagénesis dirigida de la superficie enzimática.

La mutagénesis dirigida ha sido una de las herramientas más comunes a la hora de averiguar la contribución de un determinado aminoácido en la estabilidad o actividad de una proteína (Hult y Berglund, 2003; Liu *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Se ha estudiado tanto el efecto de mutar residuos superficiales como residuos en el centro activo con el fin de caracterizar o mejorar las propiedades de la proteína (Perl *et al.*, 2000).

Se podrían introducir nuevos aminoácidos que facilitasen la interacción entre la enzima y el soporte en zonas de la enzima donde con la enzima nativa no sería posible lograr la inmovilización (Abián *et al.*, 2004a; Grazú, 2006; Iwakura y Kokubu, 1993; Mansfeld *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 1990).

Para realizar un diseño racional del lugar dónde insertar las mutaciones, es necesario conocer la estructura de la proteína de interés o la estructura de una proteína homóloga. Realizando sólo las mutaciones en la superficie proteica se intentará evitar la desestabilización de la estructura tridimensional de la proteína (Hawrani *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1993). Mediante estudios de dinámica molecular es posible predecir si estos cambios distorsionarán la estructura tridimensional de la proteína durante el plegamiento como paso previo a la obtención en el laboratorio de los mutantes (Brünger *et al.*, 1990). Las mutaciones introducidas permitirían incrementar el número de grupos reactivos superficiales para mejorar la inmovilización covalente o la adsorción iónica. Para ello, es necesario realizar un estudio de la disposición espacial de los residuos a mutar ya que deben situarse suficientemente expuestos para poder interactuar con el soporte. Las mutaciones serán conservadoras con el fin de mantener la estructura y tamaño del aminoácido, variando sólo el grupo reactivo que se quiere introducir en la cadena lateral del residuo. Se intenta así evitar que haya problema alguno durante la síntesis y plegamiento de la proteína.

La mutagénesis ofrece la ventaja de, una vez se haya obtenido el mutante de interés, no ser necesario repetir el proceso cada vez que se necesite la proteína mientras se conserve el plásmido con las modificaciones introducidas. Como desventaja, la expresión y purificación del mutante requiere un mayor tiempo frente a la rapidez con la que se puede realizar la modificación química.

#### **4. DESARROLLO DE NUEVOS Y MEJORES MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN TRAS LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA ENZIMÁTICA.**

La modificación de la superficie de la enzima va a permitir el diseño de nuevos derivados enzimáticos. En este sentido, mediante las técnicas de mutagénesis dirigida o de modificación química, no se pretende mejorar en sí las propiedades intrínsecas de la enzima, tales como la actividad catalítica, la estabilidad o la solubilidad sino obtener la enzima enriquecida en distintos grupos reactivos en la superficie para el desarrollo de nuevas estrategias y mejora de los métodos de inmovilización. A su vez se espera alcanzar una estabilidad mejorada de los nuevos derivados enzimáticos en comparación con los disponibles hasta el momento. Las estrategias para obtener nuevos derivados enzimáticos propuestas se comentan a continuación.

##### **4.1 Desarrollo de una inmovilización covalente multipuntual muy intensa.**

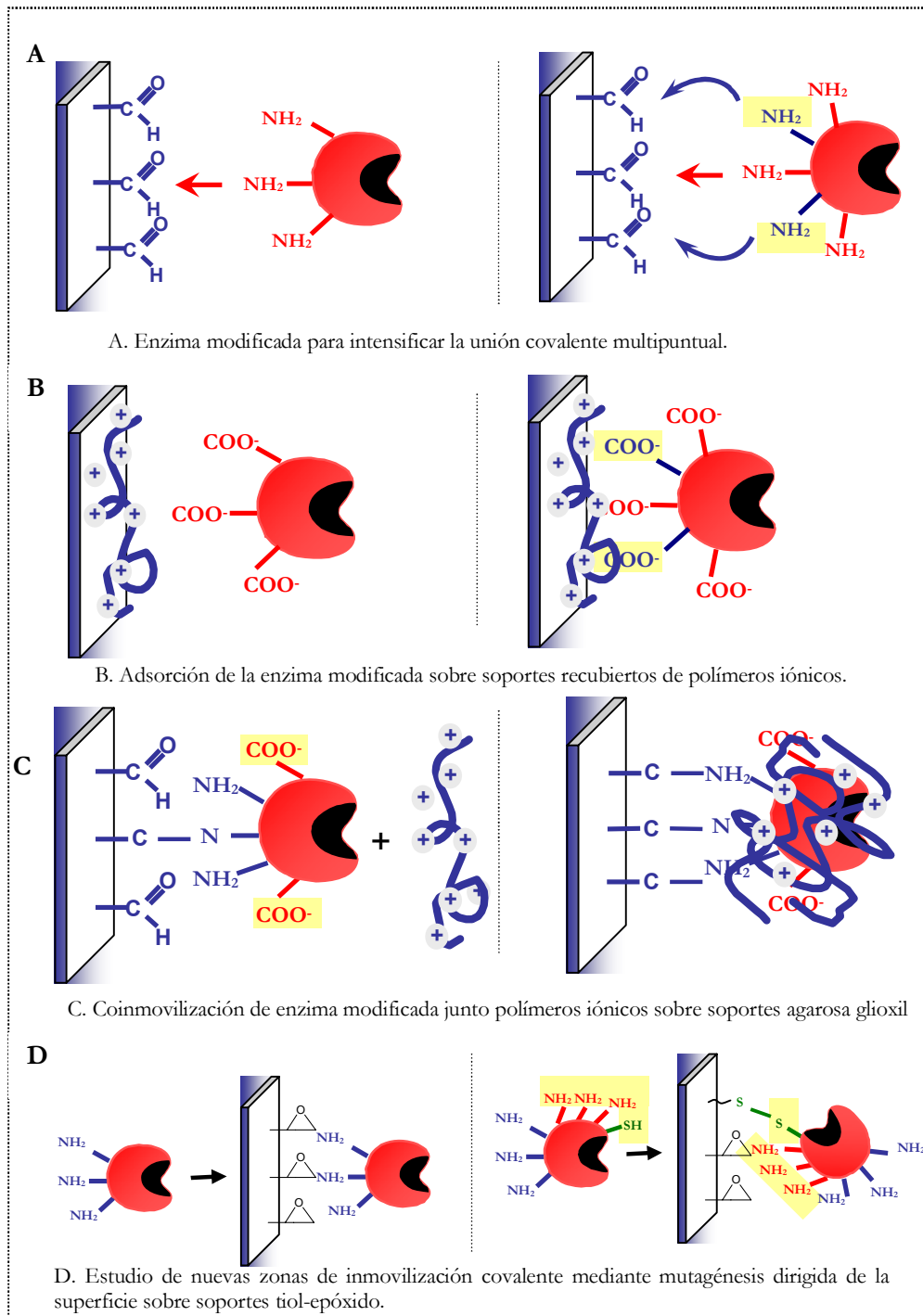
El incremento de grupos aminos primarios mediante aminación química permitiría intensificar la unión covalente sobre los soportes agarosa glioxil (*Introducción 2.1.1*). Al aumentar el número de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte se podría lograr una rigidificación de la estructura proteica. Esta rigidificación podría llevar a un incremento en la estabilidad conformacional de la proteína inmovilizada y, por lo tanto, estabilizarla frente a distintos agentes desnaturizantes (elevadas temperaturas, disolventes orgánicos, pH, etc) (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999a; Klibanov, 1983a; Mateo *et al.*, 2000a; Mateo *et al.*, 2001).

Al introducir grupos reactivos se generan nuevas zonas por las que la proteína puede orientarse sobre el soporte donde antes no era posible ya que no presentaba grupos nucleófilos capaces de reaccionar con el soporte, dando lugar a derivados enzimáticos que podrían presentar nuevas propiedades (**Figura 10A**).

##### **4.2 Desarrollo del aumento de la adsorción proteica sobre poliméricos iónicos.**

Si se logra que la enzima no se desorba de soportes poliméricos iónicos en condiciones de alta fuerza iónica permitiría un mayor potencial para su aplicación industrial (*Introducción 2.2 1*).





**Figura 10.** Estrategias de inmovilización desarrolladas tras la modificación de la superficie enzimática.      Modificación introducida.

La enzima modificada química o genéticamente presenta un incremento de cargas positivas o negativas en toda su superficie permitiendo que los polímeros iónicos (PEI/DS) interaccionen con un mayor número puntos con la enzima, embebiéndola en la matriz más que la enzima nativa y evitando así su desorción (**Figura 10B**).

Esta estrategia también permitiría mejorar la estabilidad de la enzima frente a disolventes orgánicos al generar microambientes hidrofílicos alrededor de la enzima, promoviendo cierto reparto de las moléculas de codisolvente orgánico y disminuyendo la concentración de disolvente en el entorno de la enzima. Esta estabilización se ha logrado mediante distintas aproximaciones experimentales como por ejemplo la coinmovilización de enzimas y polímeros en soportes sólidos (Fernández-Lorente *et al.*, 2000), la adsorción de enzimas en soportes recubiertos con polímeros (Giordano *et al.*, 2006) (Fuentes *et al.*, 2004b) o la coagregación de enzimas y polímeros (Wilson *et al.*, 2004). En estos casos las interacciones entre los polímeros y la enzima permiten crear una capa hidrofílica que recubre totalmente la superficie de la enzima, protegiéndola del efecto desnaturalizante del codisolvente orgánico.

#### 4.3 Desarrollo de derivados enzimáticos rodeados de microambientes altamente hidrofílicos.

Si se consigue intensificar la adsorción de la proteína modificada a soportes poliméricos se podrían combinar ambas estrategias de inmovilización (unión covalente y adsorción iónica) para el diseño de nuevos derivados enzimáticos.

Tras haber logrado el aumento del número de cargas negativas en la superficie mediante mutagénesis dirigida o modificación química se podría coinmovilizar la enzima y el polímero catiónico PEI sobre los soportes agarosa glioxil. Tanto los grupos amino primario de la enzima como las aminas primarias de la PEI serían capaces de reaccionar con los grupos aldehído del soporte, dando lugar a un derivado donde la enzima quedaría recubierta por el polímero y, a su vez, inmovilizada covalentemente sobre el soporte. (**Figura 10C**). Se lograría obtener derivados que permitan combinar tanto la estabilización lograda por la unión covalente multipuntual junto con el hecho de recubrir la enzima con el polímero iónico. Estos derivados podrían ser utilizados en reacciones donde la estabilidad frente a disolventes orgánicos es un factor limitante (Abián *et al.*, 2004b; Illanes y Fajardo, 2001; Rosell *et al.*, 1998; Schroen *et al.*, 1999; Waldmann *et al.*, 1996).

#### 4.4 Desarrollo de una estrategia para el estudio de nuevas zonas involucradas en la inmovilización covalente multipuntual.

La mutagénesis dirigida permite la introducción de mutaciones en zonas de la proteína que se seleccionen y poder dirigir la inmovilización por dicha zona seleccionada (Huang *et al.*, 1997; Iwakura y Kokubu, 1993; Mansfeld y Ulbrich-Hofmann, 2000; Persson *et al.*, 1990). Por ejemplo, introduciendo un único residuo de cisteína en la superficie de la proteína se puede dirigir la inmovilización sobre soportes epóxido–tiol mediante intercambio tiol-disulfuro (Grazú, 2006). El grupo tiol es el grupo nucleófilo más reactivo en condiciones suaves de reacción y su frecuencia en la superficie proteica es baja o nula si se compara con otros nucleófilos como hidroxilo y amino (Hemarson, 1996).

En primer lugar se estudiarían zonas en la superficie de la proteína por las que la enzima nativa no podría unirse de forma covalente multipuntual al soporte por carecer de residuos nucleófilos. La introducción de una cisteína en esa zona dirigiría la inmovilización sobre el soporte epóxido-tiol a través del enlace disulfuro. Una vez que es posible inmovilizar la enzima por un punto en el soporte se diseñaría un enriquecimiento en nucleófilos entorno a la cisteína para establecer la unión covalente multipuntual. Se podrían sustituir posibles nucleófilos como fenilalaninas y argininas por tirosinas y lisinas, residuos que podrían establecer una unión covalente multipuntual con el soporte epóxido. Se lograría así la inmovilización orientada de la proteína sobre el soporte junto con la simultánea rigidificación de la estructura proteica mediante la formación de múltiples enlaces covalentes irreversibles. Estudios de estabilización térmica y frente a codisolventes serían interesantes para caracterizar la rigidificación de la estructura tridimensional de la enzima. **(Figura 10D).**

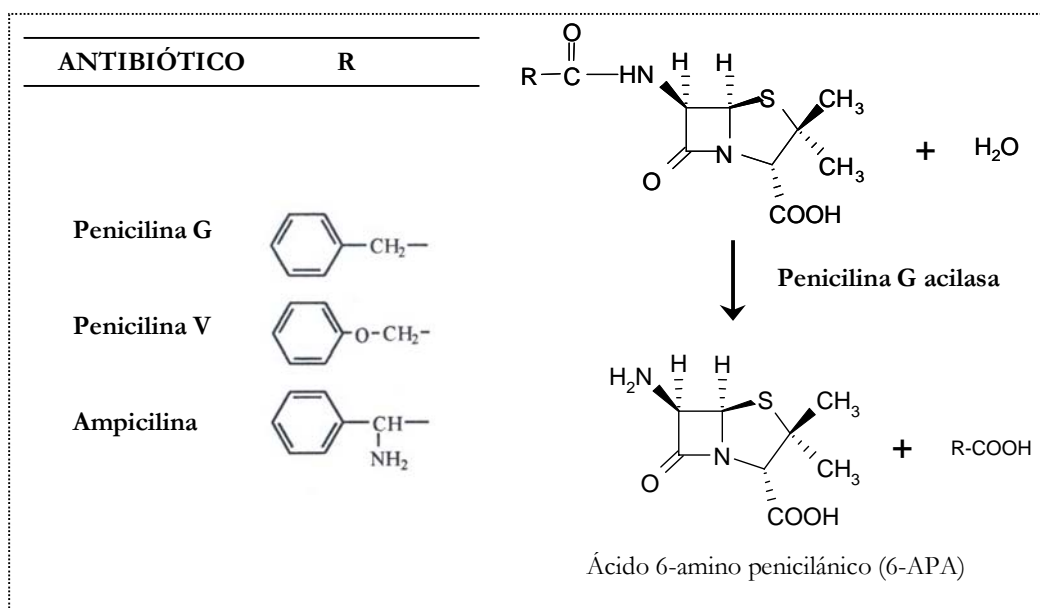
La enzima empleada como modelo en esta Tesis Doctoral ha sido la penicilina G acilasa de *Escherichia coli* dado el interés industrial que presenta como biocatalizador y se conoce su estructura tridimensional.

## 5. PENICILINA G ACILASA (PGA) DE *E. coli*.

Las penicilina acilasas están presentes en una gran variedad de microorganismos que incluyen bacterias gram positivas y negativas, hongos filamentosos y levaduras. Pueden ser periplasmáticas en el caso de bacterias gram negativas (*E. coli*, *K. citrophila*, *P. rettgeri*, *A. faecalis*), ser secretadas al medio en el caso de bacterias gram positivas como *B. megaterium* o *A. viscosus* e incluso intracelulares (*Bacillus sp*) (Arroyo *et al.*, 2003; Parmar *et al.*, 2000; Sudhakaran *et al.*, 1992). Según la especificidad de sustrato que presenten se pueden clasificar en 3 tipos (**Figura 11**) (Arroyo *et al.*, 2003; McVey *et al.*, 2001):

- Tipo I: hidrolizan preferentemente fenoximetilpenicilina (penicilina V).
- Tipo II: actúan preferentemente sobre la benzilpenicilina (penicilina G) aunque tienen un espectro de acción más amplio.
- Tipo III: hidrolizan la ampicilina (D- $\alpha$ -aminobencilpenicilina).

La PGA más utilizada en la industria farmacéutica es la aislada de la cepa ATTC 11105 de *E. coli* y pertenece dentro de la clasificación anterior al tipo II (Travascio *et al.*, 2002).



**Figura 11.** Clasificación de las penicilina acilasas según su preferencia de sustrato. La hidrólisis sobre la cadena lateral de las penicilinas dará lugar a 6-APA.

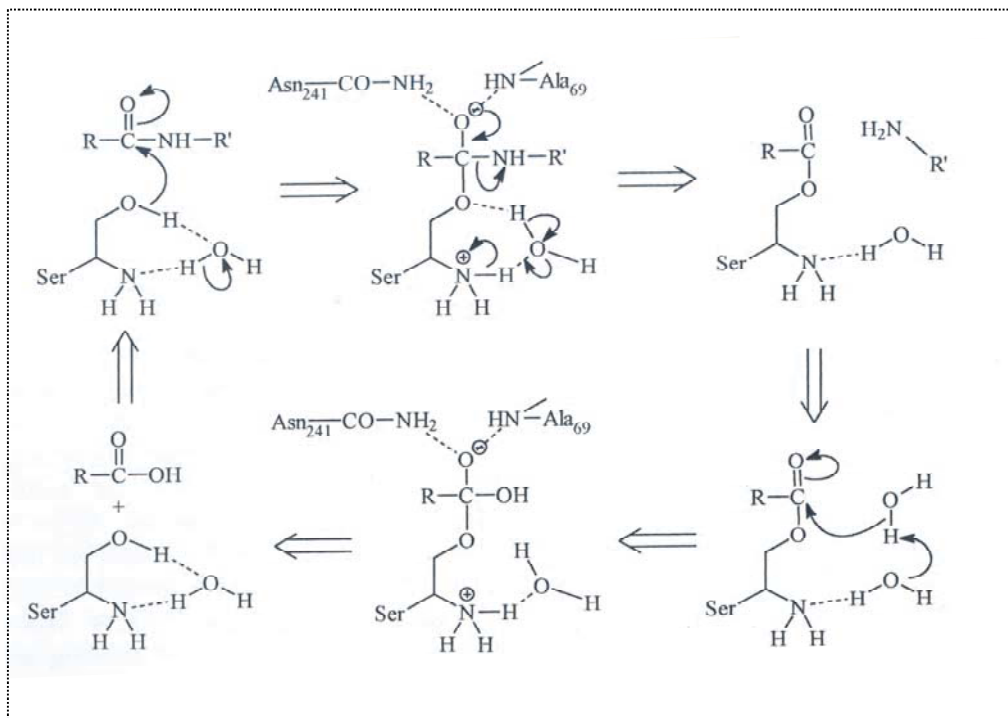
## 5.1 Biología, estructura y función de la PGA.

La enzima penicilina G acilasa (penicilina amidohidrolasa E.C. 3.5.1.11) fue descubierta independientemente por 4 grupos de investigación en 1960 (Claridge *et al.*, 1960; Huang *et al.*, 1960; Kaufmann y Bauer, 1960; Rolinson *et al.*, 1960). El papel que juega la enzima en la naturaleza aún se desconoce pero se ha propuesto que puede participar en el metabolismo de derivados de fenilacético como fuente de carbono (Merino *et al.*, 1992; Valle *et al.*, 1991). El gen *pac* en *E. coli* está localizado cerca del *cluster* de genes que codifican para la vía de degradación del ácido 4-hidroxifenilacético (Prieto *et al.*, 1996) lo que sugiere que los compuestos fenilacetilados seguirían esta ruta de degradación. También se puede considerar un mecanismo de defensa frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos naturales.

Entre sus aplicaciones más importantes está la obtención del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) mediante la hidrólisis de la penicilina G. El 6-APA un intermediario clave para la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Alkema *et al.*, 2000; Kallenberg *et al.*, 2005; Sio y Quax, 2004).

La PGA pertenece a la superfamilia de las hidrolasas de nucleófilo N-terminal (Ntn hidrolasas) que se caracteriza por presentar el residuo catalítico en el extremo amino de la cadena peptídica. En el caso de la PGA es la serina el aminoácido que está situado en el extremo N-Terminal de la subunidad  $\beta$ . Otra característica de esta superfamilia es que la activación de la enzima transcurre a través de un proceso autocatalítico (Kasche *et al.*, 1999). El plegamiento típico de una Ntn hidrolasa corresponde a una estructura secundaria tipo  $\alpha\beta\beta\alpha$  formada por dos láminas  $\beta$ -antiparalelas y recubiertas por una capa de  $\alpha$ -hélices a cada lado (Oinonen y Rouvinen, 2000).

La resolución de las estructuras cristalinas de distintas acilasas (Barends *et al.*, 2004) ha revelado que el mecanismo catalítico de estas enzimas conlleva la formación de un intermediario acil-enzima (Duggleby *et al.*, 1995; McVey *et al.*, 2001). El mecanismo propuesto para la hidrólisis de penicilina G de la PGA de *E. coli* es muy similar al mecanismo de otras serin proteasas (**Figura 12**). El grupo hidroxilo de la serina del extremo amino de la subunidad  $\beta$  es activado, mediante un puente de hidrógeno, por su propio grupo  $\alpha$ -amino. El oxígeno de la serina reacciona con el átomo de carbono del grupo acilo del sustrato, formando un tetraedro intermediario (Td 1) que es estabilizado a través de puentes de hidrógeno con los residuos asn $\beta$ 241 y ala $\beta$ 69 (hueco oxianiónico). El reagrupamiento electrónico provoca el colapso del intermediario dando lugar a la

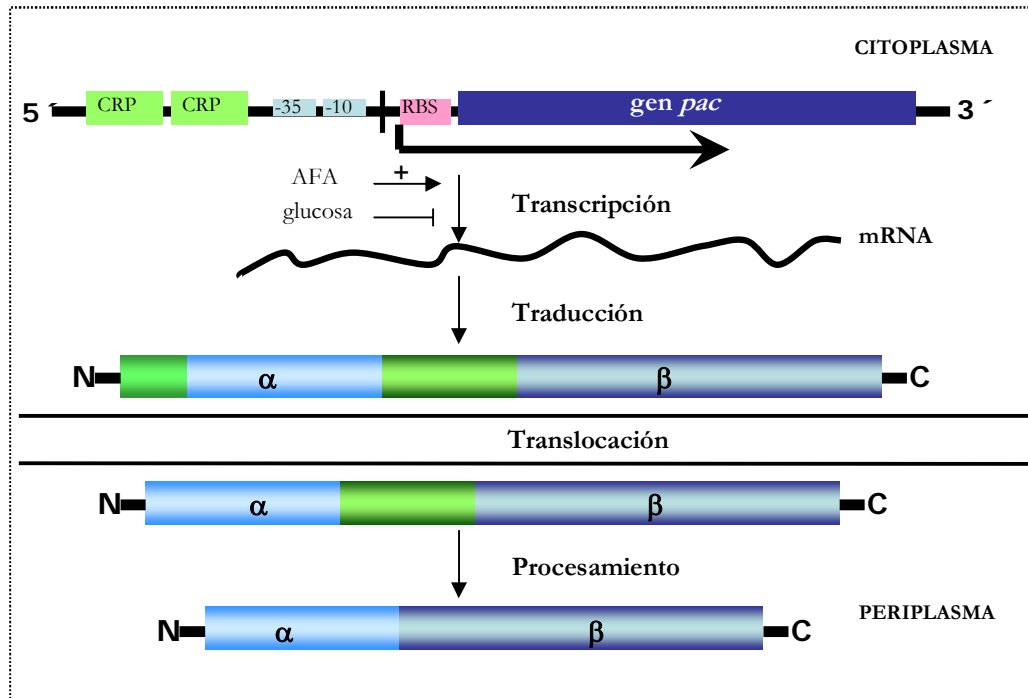


**Figura 12.** Mecanismo catalítico de la PGA.

liberación del grupo saliente y al acil enzima. Seguidamente la enzima es deacilada por un nucleófilo dejando libre a la enzima y al producto de acilación del nucleófilo.

En el caso de que el nucleófilo presente sea el agua, la hidrólisis del antibiótico  $\beta$ -lactámico dará lugar al núcleo libre junto con el ácido carboxílico de la cadena lateral. Sin embargo, si en la reacción está presente como donador de acilo un sustrato activado (éster o amida), el ataque nucleofílico originará un antibiótico semisintético.

La PGA de *E. coli* se sintetiza como un pre-propéptido cuya secuencia señal de 26 aminoácidos (pre) dirige la proteína a la membrana citosólica para la translocación de la proteína al periplasma (**Figura 13**). Se ha descrito que esta translocación ocurre principalmente por un mecanismo mediado por el transportador tipo Tat (Ignatova *et al.*, 2000). Una vez en el espacio periplasmático ocurre la activación autoproteolítica del precursor mediado por el péptido conector de 54 aminoácidos (secuencia pro).



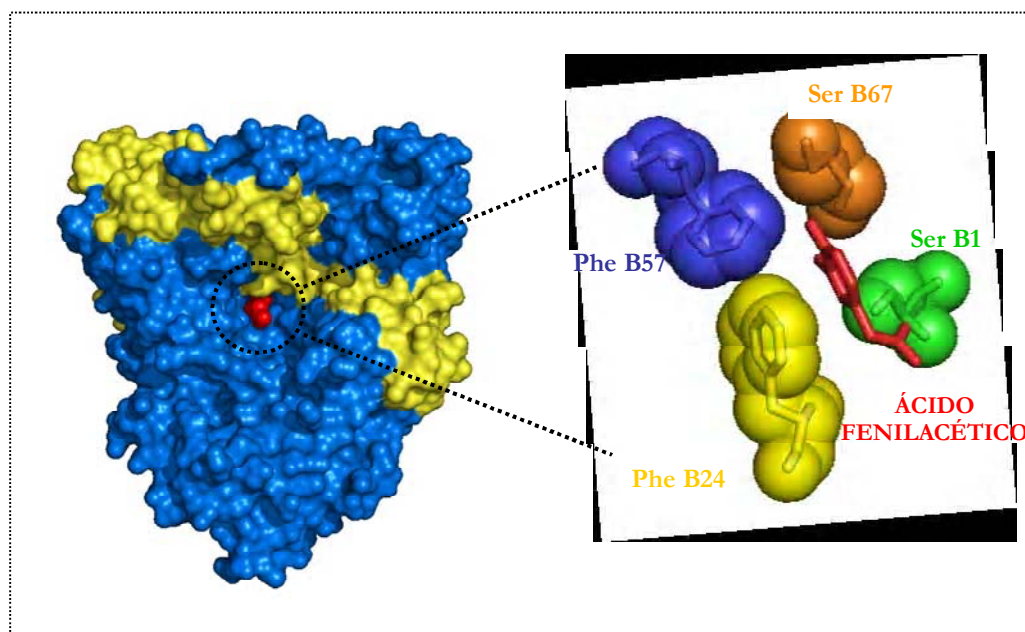
**Figura 13.** Síntesis y maduración de la PGA de *E. coli*.

La pro-enzima inactiva es primero activada por una autoproteólisis intramolecular, y luego por una autólisis intermolecular (Kasche *et al.*, 1999). El péptido espaciador entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  bloquea el sitio activo y se ha descrito recientemente que es necesario para el correcto plegamiento de la proteína (Ignatova *et al.*, 2005). La enzima activa contiene un ion  $\text{Ca}^{+2}$  unido fuertemente a su estructura como cofactor pero que no está directamente involucrado en su función biológica (Kasche *et al.*, 2005). Residuos de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima coordinan este ión, y se cree que su función es estabilizar la interfase entre ambas cadenas (Hewitt *et al.*, 2000; Kasche *et al.*, 2003). La unión de este ión es necesaria para el transporte de la proenzima a través de la membrana, para desplazar el equilibrio hacia la conformación nativa y para facilitar el procesamiento autocatalítico de la proenzima (Ignatova *et al.*, 2005; Kasche *et al.*, 2005).

A nivel transcripcional y de traducción, se pueden obtener elevados rendimientos de producción estabilizando el RNAm y aumentando la tasa de síntesis del pre-proenzima. Esto se puede lograr transformando las bacterias con plásmidos de alto número de copia

que contengan el gen de la PGA. Durante la síntesis ribosomal, polipéptidos adyacentes se acercan pudiendo plegarse juntos y esto conlleva a la formación de cuerpos de inclusión (Mitraki, 1991). Para reducir la formación de estos cuerpos de inclusión es necesario disminuir la temperatura de cultivo. Se ha observado un aumento de 20 veces en la producción de la enzima activa si se reduce la temperatura de 37 a 28°C.

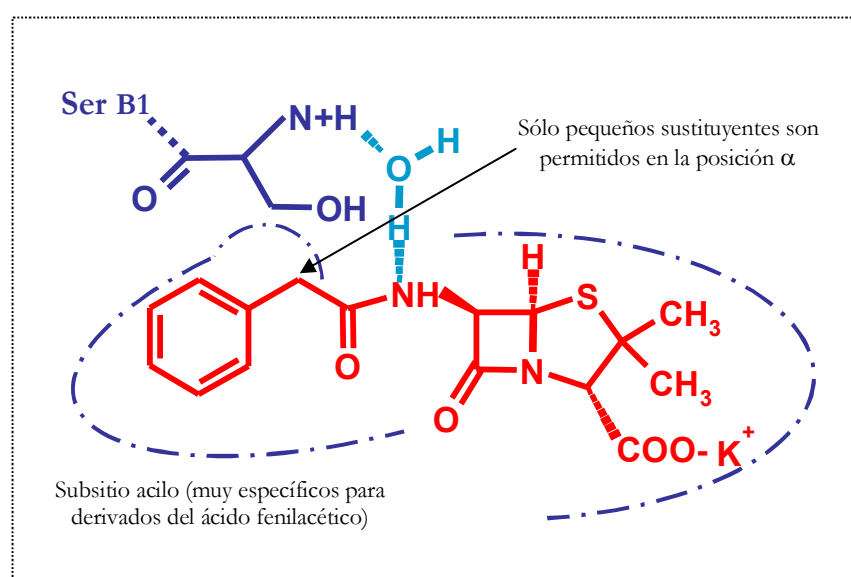
La enzima madura es un heterodímero de 86 kDa formado por una subunidad  $\alpha$  de 23.8 kDa (209 aminoácidos) y una subunidad  $\beta$  de 63.4 kDa (557 aminoácidos), muy entrelazadas y unidas por fuerzas no covalentes (McVey *et al.*, 2001). Presenta una estructura piramidal con una profunda depresión central al fondo de la cual se localiza el centro activo (**Figura 14**). El sitio de unión al sustrato está formado por residuos hidrofóbicos de ambas subunidades y define la especificidad por el grupo fenilacetilo de la penicilina G (Alkema *et al.*, 2002). Mediante estudios de mutagénesis, modificación química y modelado molecular se han determinado los residuos importantes para la catálisis. (Alkema *et al.*, 2000; Guncheva *et al.*, 2004; Kazan y Erarslan, 2001; McLanahan, 2003; Morillas *et al.*, 1999; Morillas *et al.*, 2003; Oinonen y Rouvinen, 2000).



**Figura 14.** Estructura PGA madura. Cadena  $\alpha$  en amarillo; cadena  $\beta$  azul. Residuos de unión al sustrato (phe 57B; phe 24B y ser 67B) y residuo catalítico ser B entorno al ácido fenilacético en el sitio activo.



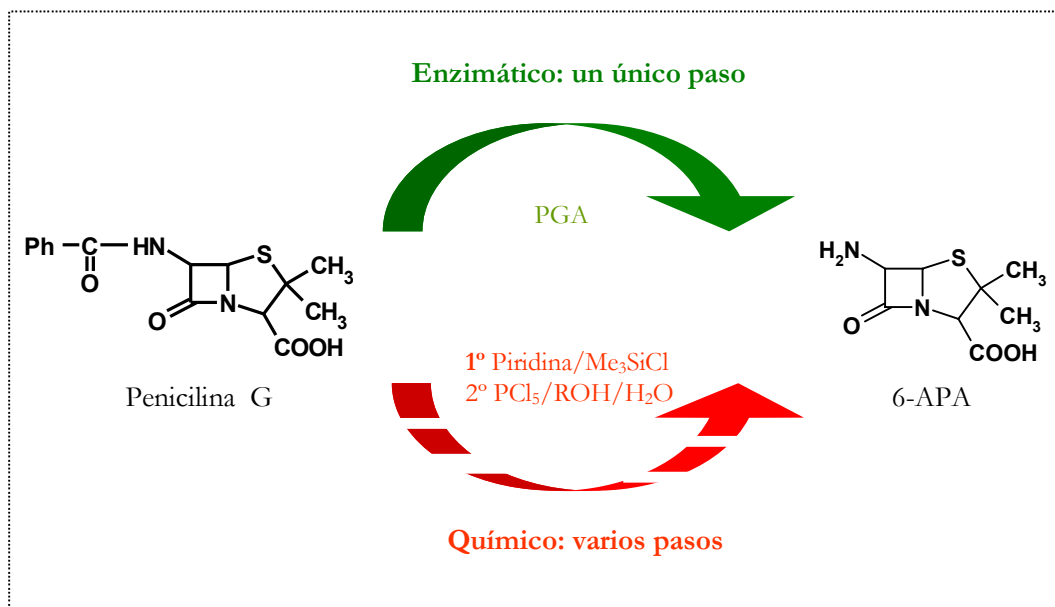
La PGA presenta una compleja especificidad de sustrato. El subsitio de unión del radical acilo es altamente específico para ácido fenilacético; tan sólo prepequeños grupos, como hidroxilo o grupos amino están permitidos en la posición  $\alpha$ . En cambio, el sitio de reconocimiento de la penicilina es altamente específico para L-aminoácidos y también es capaz de discriminar otras aminas primarias quirales (Calleri *et al.*, 2004; Kallenberg *et al.*, 2005) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Especificidad de sustrato de la penicilina G acilasa. Adaptado de Kallenberg *et al.* (2005).

## 5.2 Interés industrial de la PGA.

Desde que fue descubierta en los 60, la PGA fue utilizada para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), producto intermedio en la síntesis de fármacos betalactámicos semisintéticos. Inicialmente el proceso no era rentable ya que la productividad era baja y el biocatalizador (la célula completa) se desechaba tras el uso. Pronto este proceso se sustituyó por el método químico (Bruggink y Roy, 2001).



**Figura 16.** Hidrólisis de penicilina G para la obtención de 6-APA por método enzimático y químico.

Tras lograr PGAs con una estabilidad mejorada mediante *screening* y técnicas de biología molecular, se mejoró la producción. Esto, unido a la inmovilización de la enzima que permitía el reciclado del catalizador, permitió que a mediados de los 80, comenzase a utilizarse el proceso enzimático de hidrólisis de penicilina G (Van De Sandt y De Vroom, 2000) ya que presentaba grandes ventajas económicas, medioambientales y operacionales frente al proceso químico (**Figura 16**). En la actualidad se obtienen aproximadamente 20000 t anuales de 6-APA con un excelente rendimiento (Kallenberg *et al.*, 2005). La mayor parte de los biocatalizadores disponibles comercialmente para la producción de penicilina G, como por ejemplo Altus Biologics (CLEC-EC®), Recordati, Roche Diagnostics (Enzygel®) y Rhöm (Eupergit PcA) están basados en la PGA de *E. coli*.

La PGA es una enzima notablemente versátil que, además de en la hidrólisis de penicilina G, puede utilizarse en numerosas reacciones de interés en química orgánica:

- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes, ésteres y aminas mediante reacciones enantioselectivas de hidrólisis o síntesis (Rocchietti *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 1999; Van Langen *et al.*, 2000).
- Acilación inespecífica de nucleófilos (Rosell *et al.*, 1993) (Basso *et al.*, 2001; Stambolieva *et al.*, 1992).
- Protección de grupos en síntesis de péptidos (Didziapetris y Svedas, 1991; Fite *et al.*, 1997).
- Síntesis de derivados de penicilinas y cefalosporinas (Arroyo *et al.*, 2003; Bruggink y Roy, 2001; Wegman *et al.*, 2001).

Además de la hidrólisis de la penicilina G, la PGA cataliza la reacción inversa permitiendo la síntesis de antibióticos. El principal obstáculo en la síntesis cinéticamente controlada es que viene acompañada tanto de la hidrólisis del donador de acilo como del producto. Por lo tanto, la eficiencia del proceso viene determinada por la razón síntesis/hidrólisis (S/H, mol de producto por mol hidrolizado de donador de acilo) (Bruggink *et al.*, 1998). Debido a la necesidad de inmovilizar la enzima para que el proceso sea rentable, aparecen los problemas difusionales. El efecto combinado de la eficiencia intrínseca de transferencia de acilo (S/H) de la PGA junto con las limitaciones difusionales hacen que el uso industrial del enzima en síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos siga dependiendo exclusivamente en métodos químicos (Bruggink y Roy, 2001). A mediados de los 90 se logró implementar como proceso industrial la síntesis de cefalexina por Chemferm (DSM) mediante el uso de PGA inmovilizada. DSM, recientemente, ha anunciado también la producción enzimática de amoxicilina y cefadroxil (Anti-infectives, 2004).

### 5.3 Desarrollo de nuevos derivados de PGA.

Como se ha comentado en el párrafo anterior una de las claves para implementar el proceso enzimático en la industria fue lograr una eficiente inmovilización de la enzima.

Si bien la enzima PGA se utiliza actualmente a escala industrial en la hidrólisis de penicilina G o de cefalosporina G, para producir los correspondientes ácidos 6-aminopenicilánico (6-APA) o ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), la

productividad del biocatalizador aumentaría si se pudiese mejorar la estabilidad de la enzima (Giordano *et al.*, 2006; Parmar *et al.*, 2000).

Mejorar la estabilidad térmica de la misma es de interés industrial porque el aumento de la temperatura hace posible que se incremente la velocidad de reacción, se pueden desplazar los equilibrios termodinámicos, aumentar la solubilidad de sustratos y disminuir la viscosidad del medio.

Mediante distintos métodos de inmovilización que permiten una unión covalente multipuntual, ha sido posible obtener derivados de PGA muy estables térmicamente (Abián *et al.*, 2004a; Grazú, 2006; Mateo *et al.*, 2002; Mateo *et al.*, 2000c). Lo que se pretende en esta Tesis es lograr, tras la modificación de la superficie de la PGA bien química o genéticamente, intensificar la unión covalente multipuntual de la enzima al soporte para rigidificar la estructura tridimensional y obtener así derivados aún más estables térmicamente.

También es interesante mejorar la estabilidad de la PGA de *E. coli* frente a codisolventes orgánicos que conllevan a la inactivación rápida de la enzima. Este es un problema a la hora utilizar el biocatalizador en los procesos de síntesis termodinámicamente controlada de antibióticos (Rosell *et al.*, 1998). El uso de codisolventes orgánicos en reacciones de síntesis catalizadas por hidrolasas resulta fundamental para favorecer el desplazamiento del equilibrio de la reacción en la dirección de síntesis o para aumentar el rendimiento de la reacción (Gololobov *et al.*, 1992; Kasche, 1986)

Es posible aumentar la estabilidad de la enzima en presencia de un porcentaje elevado de codisolvente (50-90%), disminuyendo la concentración efectiva del mismo en el microambiente de la enzima (Abián *et al.*, 2002; Fernández-Lafuente *et al.*, 1996). Sin embargo, la aplicación de estas estrategias a la PGA no se ha logrado con éxito debido a la dificultad de adsorción de la enzima a los polímeros iónicos (dextrán sulfato y polietilénimina) (Fuentes *et al.*, 2004b).

El desarrollo de biocatalizadores robustos es uno de los mayores retos en la biotecnología industrial como lo demuestra el interés actual en este campo de investigación (Bickerstaff, 1997; Tischer y Kasche, 1999) (Subramanian *et al.*, 1999).

## OBJETIVOS

---

---

Como objetivo general de esta Tesis Doctoral se pretende modificar la superficie de la enzima penicilina G acilasa de *E. coli* para el desarrollo de nuevas estrategias de inmovilización de la enzima, y la mejora de las propiedades funcionales (sobre todo estabilidad) de las enzimas inmovilizadas. Mediante técnicas de modificación química y de mutagénesis dirigida se pretende introducir en la superficie de la PGA nuevos grupos capaces de reaccionar con los grupos reactivos del soporte dando lugar a nuevos derivados enzimáticos de interés industrial.

Se plantea como hipótesis que los procesos iniciales de inactivación de enzimas suelen estar constituidos por pequeños cambios conformacionales reversibles cuya restricción aumenta considerablemente la estabilidad de la enzima frente a agentes distorsionantes. Se podría reducir esta distorsión incrementando el grado de interacción entre el soporte y la enzima tras alterar la superficie de la misma.

La modificación química y la mutagénesis dirigida permitirán la introducción de nuevos grupos en la superficie de la enzima no con el fin de mejorar en sí las propiedades de la enzima soluble sino mejorar dos tipos de inmovilización más frecuentes de interés industrial: la inmovilización covalente o la adsorción iónica. Una vez obtenidos los derivados enzimáticos se podrá evaluar su estabilidad frente a calor, pH, disolventes, etc.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral serán los siguientes:

1. Modificación química de los grupos amino primario de la superficie de la PGA mediante su reacción con anhídrido succínico. Con esta modificación se pretende lograr adsorber la enzima a intercambiadores aniónicos tipo agarosa polietilenimina donde la PGA nativa no es capaz de adsorberse. Se estudiará la fuerza de unión entre la enzima modificada y el soporte así como la estabilización frente a distintos agentes distorsionantes.
2. Modificación química de los grupos carboxilo de la superficie de la PGA mediante su reacción con etilendiamina. Se estudiará el efecto del incremento de grupos amino en la unión covalente multipuntual a soportes agarosa glioxil, en los que se pretende obtener una estabilidad mejorada frente a temperatura, pH y disolventes. También se inmovilizará sobre intercambiadores catiónicos tipo agarosa dextrano sulfato y se evaluará su estabilización frente a codisolventes y su fuerza de unión al soporte.

3. Aumento de grupos carboxilo en la superficie de la PGA por mutagénesis dirigida. Se diseñará un mutante de PGA en cuya superficie se incremente el número de carboxilos. Se realizará un estudio tridimensional de la proteína y mediante estudios de dinámica molecular se determinará el efecto de dichas mutaciones en la estructura como paso previo a la obtención de los mutantes. De manera análoga a la modificación química se intentará adsorber la enzima mutada sobre soportes agarosa PEI y estudiar su estabilidad. También se desarrollarán nuevas estrategias de inmovilización combinando la unión covalente multipuntual junto con la adsorción iónica del polímero (coinmovilización de PGA y PEI) en el diseño de nuevos biocatalizadores de interés industrial.
4. Aumento de residuos nucleófilos en la superficie de PGA por mutagénesis dirigida. Se introducirán mutaciones en zonas de la superficie por las que, en principio no es posible lograr la inmovilización covalente de la enzima nativa. Para dirigir la inmovilización a través de estas nuevas zonas se introducirá una cisteína capaz de reaccionar con los grupos tiol reactivos del soporte tiol-epoxido ya que la PGA nativa no presenta ninguna en su superficie. Se estudiará si estas nuevas zonas de inmovilización generadas permiten la estabilización frente a temperatura y codisolventes de los derivados enzimáticos obtenidos.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

---



## 1. REACTIVOS.

Proveedor	Reactivo
Antibióticos S.A. (León España)	Penicilina G Penicilina G acilasa de <i>E. coli</i>
Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia)	Agarosa 4 BCL-Bromuro de cianógeno (BrCN) Agarosa carboximetil (CM) Agarosa 4 BCL-DEAE Columnas PD 10 Sephadex G-25
Fluka (Buchs, Suiza)	Dimetilformamida (DMF) Dioxano 2,3-epoxi-4-propanol (glicidol) Glutaraldehído 25% Penicilina G acilasa de <i>E. coli</i> -Eupergit®
Hispanagar S.A. (Burgos, España)	Agarosa 4 BCL Agarosa 10 BCL
Invitrogen (Paisley, UK)	Champion™ pET direccional TOPO® Expression Kit
Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)	Ácido 6 nitro-3-(fenilacetamido)-benzoico (NIPAB) Anhídrido succínico Borohidruro sódico Dextrano sulfato 10 KDa 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) (EDAC) 2,2'-dipiridildisulfuro (2-PDS) Ditiotreitol (DTT) Etilendiamina (EDA) Hidroxilamina Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) (R)-(-)-Mandelato de metilo Polietilenimina (25, 60 y 600 kDa) 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS)
Pierce (Rockford, USA)	Coomasie Brilliant Blue
QIAGEN GmbH (Hilden, Alemania).	QIAquick Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics SL (Barcelona, España).	High Pure Plasmid Isolation Kit <i>EcoRV</i>
Rohm Pharma GmbH (Darmstadt, Alemania)	Eupergit C
Stratagene (La Jolla, CA, USA).	QuickChange Mutagenesis Kit <i>DpnI</i>

**Tabla 1.** Reactivos utilizados. El resto de reactivos y solventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico.

## 2. CEPAS DE *E. coli*.

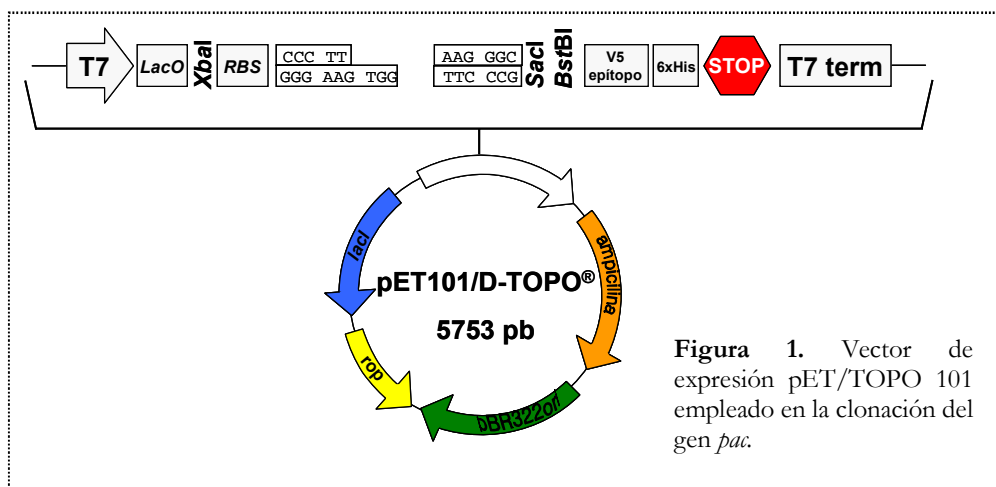
En la **Tabla 2** se encuentran resumidas las cepas bacterianas que se han utilizado. La preparación de las células competentes DH5 $\alpha$  y BL21 se llevó a cabo con el método de Hanahan (1983).

Especie/Cepa	Genotipo-Fenotipo relevante	Referencia u origen
<i>E.coli</i> One Shot®	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>m rr-hsd RMS - mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deo R</i> <i>araD239</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> <97697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E.coli</i> BL 21 Star® (DE3)	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>)gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen (Studier <i>et al.</i> 1986)
<i>E.coli</i> D H 5a	( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15). <i>supE44</i> , 17( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1985)

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas.

## 3. VECTORES

Para la construcción de plásmidos empleados en este trabajo (**Tabla 3**) se utilizó como vector de clonación pET101/D-TOPO® (**Figura 1**). En este sistema los productos de PCR son clonados de forma direccional al adicionar cuatro pares de bases (CACC) en el oligonucleótido de clonación del extremo 5'. De esta manera el extremo saliente del vector (GTGG) invade el extremo del producto de PCR, hibrida con las bases adicionales, y estabiliza el producto de PCR en la dirección correcta. Presenta el gen de resistencia a ampicilina (*Amp*) para la selección de transformantes en *E. coli*.



**Figura 1.** Vector de expresión pET/TOPO 101 empleado en la clonación del gen *pac*.

Nombre	Construcción	Referencia
pOAF	gen <i>pac</i> de <i>E. coli</i>	Abián <i>et al.</i> , 2003
pPGA8glu	gen <i>pac</i> con 8 mutaciones a Glu	Este trabajo
pPGA8sup	gen <i>pac</i> con 7 mutaciones a nucleófilos	Este trabajo
pPGA8post	gen <i>pac</i> con 6 mutaciones a nucleófilos	Este trabajo
pPGAB437	gen <i>pac</i> con 4 mutaciones a Lys	Grazú <i>et al.</i> , 2006

**Tabla 3.** Plasmidos utilizados en este trabajo.

#### 4. MEDIOS DE CULTIVO.

**Luria-Bertani (LB):** 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) triptona, 1% (p/v) cloruro sódico (Sambrook y Russell, 2001). El medio LB sólido se preparó añadiendo agar a una concentración final de 1,5% (p/v). Para la selección de transformantes resistentes se añadió a este medio ampicilina en una concentración final de 150 µg/ml (LBA).

**SOC:** 0.5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) triptona, cloruro sódico 10 mM, cloruro potásico 2.5 mM, cloruro magnésico 10 mM, sulfato magnésico 10 mM y glucosa 2 mM.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave a 121°C durante 20 min.

#### 5. OLIGONUCLEÓTIDOS.

La **Tabla 4** resume los oligonucleótidos utilizados tanto en la secuenciación como en la mutagénesis dirigida del gen *pac* de la PGA de *E. coli* cepa ATCC 11005. Fueron sintetizados por Genotek (Madrid, España).

#### 6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PGA.

La unidad de enzima (UI) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de sustrato por minuto en las condiciones especificadas de ensayo.

Todos los resultados presentados representan el valor promedio de al menos tres experimentos. En todos los casos el error experimental no fue mayor del 5%.

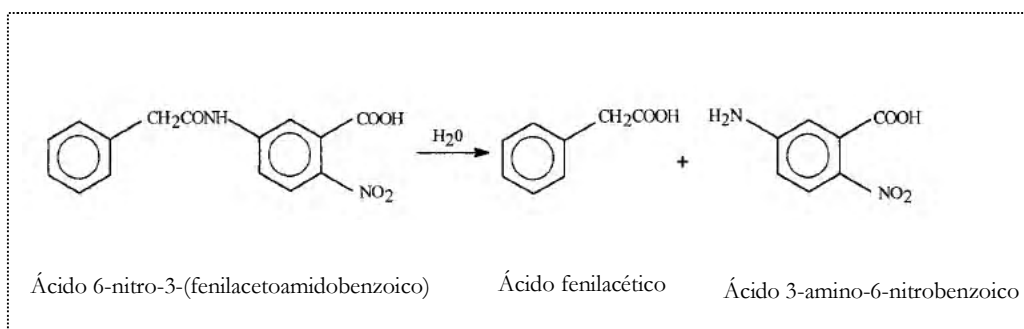
Uso	Cebador	Secuencia	Código
Clonación en vector direccional TOPO	TOPO 5'	5' - <b>CACC</b> <u><b>ATG</b></u> AAAAATAGAAATCGTATGA-3'	Topo5'
	TOPO 3'	5' - TACAACCTCCCGACCAATGAAA-3'	Topo3'
Mutante PGA 8 glu	N A108 E	5' - GACTGATAAGGT <b>AGAA</b> CCCAATCCAGAG-3'	2a
	N A108 E	3' - CTGACTATTCCAT <b>CTT</b> TGGTTAGGCTC-5'	2b
	Q B112 E	5' - GTGAAAAATGGT <b>GAG</b> CGAGAGACCTTTAC-3'	3a
	Q B112 E	3' - CACTTTTACCA <b>CTC</b> CGTCTCTGGAAATG-5'	3b
	Q B131 E	5' - ATTCTCCAACTG <b>AGAG</b> ACGACACAAACG-3'	4a
	Q B131 E	3' - TAAGAGGTTTGACT <b>GCT</b> CTGCTGTGTTGC-5'	4b
	Q B164 E	3' - GGCCAAAAAT <b>TGGAGG</b> AGTGGACACAG-5'	5a
	Q B164 E	5' - CCGGTTTTTA <b>ACCCTC</b> CTCACCTGTGTC-3'	5b
	Q B233 E	5' - GTGTATAACCC <b>GAGT</b> CGGGATATATTG-3'	6a
	Q B233 E	3' - CACATATTGGGG <b>CTC</b> AGCCCTATATAAC-5'	6b
	Q B312 E	5' - ACATCTGGTTTGAC <b>AGAG</b> CGCATCCGCGT-3'	7a
	Q B312 E	3' - TGTAGACCAACTGT <b>CTC</b> TCGTAGGCGCA-5'	7b
	Q B380 E	5' - TACGAAACAAC <b>CGAG</b> ACGCCCAACT-3'	8a
	Q B380 E	3' - ATGCTTTTGG <b>CTC</b> CTGCGGGTTGA-5'	8b
	Q B420 E	5' - GGGAAACACAG <b>GAGG</b> AGGTTGTGTTG-3'	9a
	Q B420 E	3' - CCCTTTGGTGT <b>CTC</b> CTCCAACACAAC-5'	9b
Mutante PGA sup	R A7079K	5' GATTTTGTGAAATTTGATAAAGATAT <b>CAAA</b> CGTAACACTGGCCGGATGCTAT <b>CAAA</b> GCACAAATTGCTGC3'	10a
	R A7079K	3' CTAAAAACACTTTAAACTATTTTCTATAG <b>TTTG</b> CATTGATGACCGGCTACGATAG <b>TTTG</b> CGCGTTTAACGACG5'	10b
	T B107 C	5' GTTAAGCCGTGAGGAAACCA <b>TTTGG</b> GTGAAAAATGGTCAGGCAGAGACCTTTAC3'	11a
	T B107 C	3' CAATTCGGCACTCCTTTGGTA <b>AACG</b> CACTTTTACCAGTCCGTCTCTGGAAATG5'	11b
	R A128 K	5' - CAGTTTAAATACATTTGGCTTTACTCCTAA <b>GAAT</b> GGGAACCGTTTGATGTCG3'	12a
	R A128 K	3' - GTCAAATTATGTAACCGAAATGAGGATT <b>CTTT</b> ACCCTTGGCAAACTACAGC5'	12b
	F A124 Y	5' - CCAAAACAGTTTAATACATTTGGC <b>TATA</b> CTCCTAAGCGCTGGGAAC-3'	13a
	F B124 Y	3' - GGTTTTGTCAAATTATGTAACCGAT <b>ATAG</b> GAGGATTCGGACCCCTTG-5'	13b
	R B557 K	5' - GGAAGTGTTCACGTT <b>CAGAA</b> ATAATTAAGCCCGAAAGCCCTC-3'	14a
	R B557 K	3' - CCTTCACAACGTGCAAGT <b>CTTT</b> ATTAAATTCGGGCTTCGGGAG-5'	14b
Mutante PGA post	T B278 C	5' - GCAAAAGCCACGCTT <b>TATG</b> CGCTGATCAGGCATGGG-3'	15a
	T B278 C	3' - CGTTTTCGGTGCGAAT <b>ACG</b> GACTAGTCCGTACCC-5'	15b
	R B276 K	5' - GGTTTGAGCAAAAGCC <b>AAAT</b> TATGCGCTGATCAGGC-3'	16a
	R B276 K	3' - CCAAACCTCGTTTTCGGT <b>TTTA</b> ATACGCGACTAGTCCG-5'	16b
	R B287 K	5' - CAGGCATGGGATGTTAT <b>TAA</b> CAAAACAGTAACAGGATC-3'	17a
	R B287 K	3' - GTCCGTACCCACAAATA <b>TTT</b> GTTTGGTCATTTGTCTAG-5'	17b
	R B291 K	5' - GGATGTTATTGCGCAAAACAGT <b>AAAC</b> AGGATCTTAACCTGAG-3'	18a
	R B291 K	3' - CCTACAATAAGCGGTTTGGTCA <b>TTT</b> GTCTCAGATGGACTC-5'	18b
	R B325 K	5' - CAGTTGGTAGAAACATTAA <b>CAAA</b> ATGGGATGGCATCAATTTGC-3'	19a
	R B325 K	3' - GTCAACCATCTTTGTAATTGTT <b>TACC</b> CTACCGTAGTTAAACG-5'	19b
	R B495 K	5' - CCAACGACAAGCGATA <b>AAAC</b> CTGTGCTTGCTGG-3'	20a
	R B495 K	3' - GGTGTGCTTTCGCTAT <b>TTT</b> GGACACGAAACGGACC	20b

**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida del gen *pac*. Está señalado el cambio de aminoácido y su posición en la cadena A o B de la penicilina G acilasa madura. En negrita aparecen señalados los codones que contienen la mutación en el cebador. El oligonucleótido TOPO 5' contiene el codon de iniciación del gen *pac* (en negrita y subrayado). El oligonucleótido TOPO3' hibrida con el extremo 3' de la región no codificadora del gen *pac* presente en el plásmido pOAF que permite la amplificación del extremo C-terminal de la región que codifica el gen *pac*.

### 6.1 Determinación con ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB).

La actividad de la PGA soluble y de los derivados inmovilizados se determinó de forma espectrofotométrica midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm generado por el producto de reacción ácido 3-amino-6-nitro-benzoico (coeficiente de extinción molar,  $\epsilon=9090\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a pH 7.5) en la hidrólisis de una solución de sustrato ácido 6 nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB) (Kutzbach y Rauenbusch, 1974).

Se añaden 2.5 ml de NIPAB (0.15 mM) disuelto en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y un volumen de muestra de 50-200  $\mu\text{l}$  de solución enzimática (soluble o suspensión inmovilizada). Se mantiene la mezcla de reacción a 25°C mediante un baño termoestable y con agitación magnética (**Figura 2**).



**Figura 2.** Hidrólisis enzimática de ácido 6-nitro-3-(fenilacetoamidobenzoico) NIPAB.

### 6.2 Determinación con Penicilina G-K como sustrato.

Se determinó de forma continua por valoración potenciométrica (pH stato DL50 Mettler Toledo) con NaOH 100 mM del producto de reacción ácido fenilacético (AFA) producido por la hidrólisis de penicilina G-K.

La reacción enzimática se llevó a cabo con una mezcla de reacción que contenía una solución enzimática (soluble o suspensión inmovilizada), 20ml de penicilina G-K 10 mM preparada en tampón fosfato de sodio 0.1 M, 0.5 M NaCl a pH 8.0 a una temperatura de 25°C en agitación magnética (Alvaro, 1988).

## **7. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE DE LA PGA.**

### **7.1 Modificación de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA).**

Los grupos carboxilo de la PGA soluble donada por Antibióticos S.A. y de las preparaciones inmovilizadas se modificaron con distintas concentraciones de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en presencia de etilendiamina (EDA) para controlar el grado de modificación de la enzima (Hoare y Koshland Jr, 1967).

#### **7.1.1 Aminación de la PGA soluble.**

Se suspenden 5 mL de PGA soluble (11 mg/mL) en 45 mL de EDA 1 M pH 4.75. Se añaden distintas cantidades de carbodiimida sólida a la solución anterior hasta una concentración final de  $10^{-2}$  M y  $10^{-3}$  M. Tras 90 min en agitación suave, a 25°C temperatura y pH 4.75 constante, se añaden 10 ml de hidroxilamina 0.5 M a pH 7.0 para recuperar las tirosinas modificadas (Carraway *et al.*, 1969). Después se dializa 5 veces frente a 50 volúmenes de fosfato de sodio 25 mM, pH 7.5 frente agua a 4°C. Se ha descrito que al utilizar una concentración de 1 M de EDA a pH 4.75 y 10 mM de EDAC permite una modificación de la totalidad de los grupos carboxilos de la superficie de la proteína mientras que al utilizar 1 mM EDAC sólo se modifican el 45-50% de los grupos carboxilo de la superficie (Fernández-Lafuente *et al.*, 1992).

Como ensayo control se incubará la enzima sólo con EDA y se someterá al mismo proceso descrito anteriormente.

#### **7.1.2 Aminación de la PGA inmovilizada.**

Un gramo de derivado de PGA (10UI/g de soporte) se añade a 49 ml de EDA 1 M a pH 4.75. Al igual que para la enzima soluble, se añaden distintas cantidades de carbodiimida sólida a la solución anterior hasta una concentración final de  $10^{-2}$  M y  $10^{-3}$  M. Tras 90 min en agitación suave, a 25°C temperatura y pH 4.75 constante, el derivado enzimático se filtra y se incuba durante 4 h con 0.1 M de hidroxilamina 0.1 M a pH 7.0. Transcurridas las 4 h se filtra y lava con una solución 25 mM de fosfato de sodio pH 7.5 y se guarda a 4°C.

Como control se incubará la enzima sólo con EDA y se someterá al mismo proceso descrito anteriormente.

## **7.2 Modificación de grupos amino con anhídrido succínico.**

Los grupos  $\epsilon$ -amino primarios de los residuos de lisina y amino terminal de la PGA se pueden transformar en grupos carboxilo mediante su reacción con anhídrido succínico (Klotz, 1967). Al igual que en el caso de la aminación, variando la concentración de anhídrido succínico en la reacción se logran distintos grados de modificación de la superficie de la enzima.

### **7.2.1 Succinilación de PGA soluble.**

Se incuban 50 ml de una solución de PGA soluble (5 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM pH 8.0 a 4°C. A esta disolución se le agregó poco a poco distintas cantidades de anhídrido succínico sólido con el fin de lograr la enzima modificada en distinto grado. Para ello, se emplearon distintas razones molares de reactivo respecto a la suma total de lisinas y tirosina (1:1; 1:10 y 1:20). La reacción se mantuvo a pH 8.0 durante 2 h mediante pH stat con 0.25 M de NaOH como agente valorante. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se dializó frente a 10 mM de tampón fosfato a pH 7.0 y a 4°C. La enzima succinilada se trató con 0.5 M de hidroxilamina pH 7.0 durante 5 h a 25°C y dializada de nuevo.

Como control se incubará la enzima sin anhídrido succínico bajo las condiciones descritas previamente.

### **7.2.2 Succinilación de PGA inmovilizada.**

Un gramo de derivado de PGA (10 UI/g de soporte) se incubó en tampón fosfato 10 mM pH 8.0 a 4°C. A esta disolución se le agregaron poco a poco distintas cantidades de anhídrido succínico sólido con el fin de lograr distinto grado de modificación de la superficie de la enzima. Para ello, se emplearon distintas razones molares de reactivo respecto a la suma total de lisinas y tirosina (1:1; 1:10 y 1:20). La reacción se mantuvo a pH 8.0 durante 2 h mediante pH stat con 0.25 M de NaOH como agente valorante. Una vez finalizada la reacción, se filtró el derivado y se lavó con fosfato de sodio 10 mM a pH 7.0 y a 4°C. El derivado succinilado se trató con 0.5 M de hidroxilamina pH 7.0 durante 5 h a 25°C y dializado de nuevo.

Como control se incubará la enzima sin anhídrido succínico bajo las condiciones descritas previamente.

### 7.3 Determinación del número de grupos amino primarios

Para que sea más fácil cuantificar el número de grupos amino primarios en las distintas modificaciones químicas de la PGA se realiza este ensayo sobre la enzima inmovilizada sobre el soporte agarosa BrCN, donde la enzima sólo está unida al soporte por el amino terminal. La cantidad de grupos amino primarios en las distintas preparaciones se determinó utilizando el ensayo con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) descrito por (Snyder y Sobocinski, 1975). Los derivados de PGA (250 mg) se mezclan con 3 ml de TNBS 0.1% (v/v), y la mezcla se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Como blanco se incuban 250 mg del soporte con los grupos bloqueados y 0.1% de TNBS. Los grupos amino de la enzima sin modificar inmovilizada se hacen reaccionar con glutaraldehído y se reducen posteriormente con borohidruro de sodio (Fuentes *et al.*, 2005). Los derivados se empaquetan en cubetas de 1 mm y se lee la absorbancia de la enzima no modificada y modificada a 430 nm.

## 8. DINÁMICA MOLECULAR EN LA ESTRUCTURA DE LA PGA.

Para evaluar el grado de alteración que pueden provocar las mutaciones que se quieren introducir en la estructura terciaria de la enzima, se utilizó un protocolo de simulación por dinámica molecular de enfriamiento lento, “*slow-cooling*”.

### 8.1 Análisis de la superficie proteica e introducción de mutaciones.

La simulación por dinámica molecular implica la resolución de ecuaciones clásicas de movimiento para todos los átomos de la macromolécula donde las fuerzas son derivadas de una función de energía potencial. Una vez introducidas las mutaciones en la estructura de la enzima nativa, se calienta su estructura mediante el aumento virtual de la temperatura cinética hasta una determinada temperatura. Tras alcanzar este estado se disminuye poco a poco la temperatura para que la estructura de la proteína mutada comience a plegarse lentamente “*slow cooling*” hasta alcanzar un mínimo de energía potencial. Una vez obtenidas las coordenadas de la proteína mutante plegada se comparan con las coordenadas de la enzima nativa superponiendo ambas estructuras. Para determinar si el grado de superposición entre ambas es bueno se calcula la desviación cuadrática media (r.m.s.d) (**Ecuación 1**) entre ambas estructuras, siendo aceptables valores comprendidos entre 0.1 y 0.3 Å.



$$r.m.s.d. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \left\{ (x_i - x'_i)^2 + (y_i - y'_i)^2 + (z_i - z'_i)^2 \right\}}{N}}$$

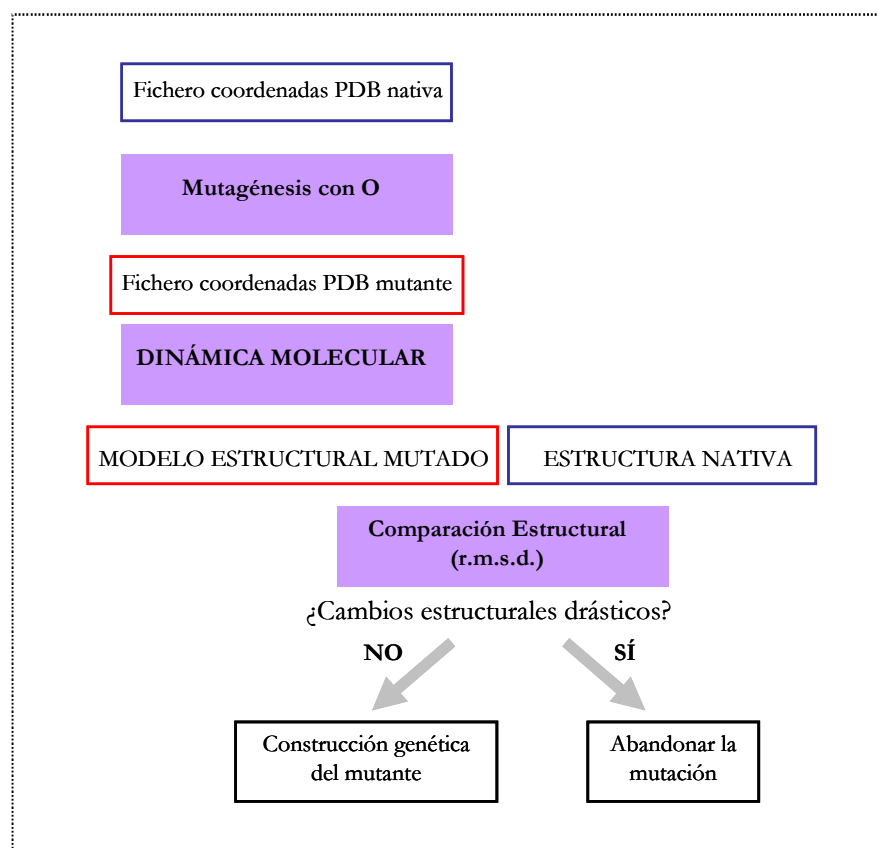
**Ecuación 1.** Cálculo de la desviación cuadrática media (rmsd) siendo  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$ , las coordenadas que definen la posición de cada átomo ( $i$ ) en el espacio y  $N$  el número total de átomos.

Si el grado de superposición entre ambas estructuras es correcto se espera que las mutaciones introducidas no afecten al plegamiento ni a la conformación tridimensional de la proteína.

La validación de este protocolo se desarrolló previamente (Abián, 2003) con la estructura cristalina de la ferredoxin reductasa de *Anabaena* PCC7119 nativa y de dos mutantes (Karplus *et al.*, 1991).

A continuación se describe, de manera esquemática, el protocolo de obtención de la estructura modelizada de los mutantes de PGA:

En primer lugar, los modelos se minimizaron utilizando el algoritmo de Powell implementado en X-PLOR (Brünger *et al.*, 1990) versión 3.851. El campo de fuerza de Eng y Huber (Engh y Huber, 1991) fue el empleado en todas las minimizaciones de energía y en las simulaciones de dinámica molecular. A continuación, el protocolo de dinámica molecular (Brünger *et al.*, 1990) se llevó a cabo durante un periodo de 1.5 ps y se aplicó utilizando el método de baño acoplado para el control de la temperatura (Berendsen *et al.*, 1984). La temperatura diana de 2500 K se redujo 25 K cada 100 pasos para alcanzar una temperatura final de 300 K. El tiempo de duración de cada paso de enfriamiento, “*time step*”, se estandarizó a 0.005 fs. Finalmente, la conformación de los distintos mutantes a 300 K se sometió a 500 pasos adicionales de minimización de energía. La **Figura 3** muestra un resumen de la estrategia utilizada para obtener el modelo estructural del mutante mediante simulación por dinámica molecular de enfriamiento lento.



**Figura 3-** Obtención del modelo estructural de mutantes mediante simulación por dinámica molecular.

## 8.2 Predicción de la alteración de la estructura tridimensional por las mutaciones introducidas.

Los modelos de los diferentes mutantes se construyeron basándose en la estructura cristalina de la PGA de *E. coli* ATCC 11105, número de acceso del *Protein Data Bank*: 1AI4 (<http://www.rcsb.org.pdb/>) (Duggleby *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 1990).

La representación gráfica y análisis de la estructura tridimensional se realizaron con el programa **Grasp** versión 1. 2-1994 (Nicholls *et al.*, 1991) y **Pymol** versión 0.99 rc6 (DeLano, 2002). Para introducir los cambios en los aminoácidos de la estructura nativa se utilizó el programa gráfico **O** (Jones *et al.*, 1991) en una terminal Silicon Graphics. Los rotámeros de las cadenas laterales se eligieron de la base de datos de conformeros más comunes (Ponder y Richards, 1987) y siguiendo criterios de estereoquímica.

## 9. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.

### 9.1 Crecimiento y conservación de estirpes bacterianas.

Las cepas bacterianas se conservaron en placa a 4°C durante un máximo de un mes y durante largos períodos de tiempo a -70°C en 20% (v/v) de glicerol. En el momento de inocularlas, se descongelaron y se incubaron en los medios correspondientes a 37°C o 28°C con una agitación de 220 rpm. Cuando fue necesario se incluyó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

### 9.2 Transformación por electroporación.

Células de *E. coli* DH5α se transformaron mediante electroporación (Sambrook et al 2000). Se añadieron de 2 a 5 µl de la solución de DNA de interés en 40 µl de células de *E. coli* electrocompetentes descongeladas y mantenidas en hielo. Esta mezcla se depositó entre los electrodos de una cubeta estéril de electroporación enfriada previamente en hielo. La cubeta, con una distancia entre electrodos de 0.2 cm, se colocó en el electroporador y se sometió a una descarga eléctrica de 2.50 kV durante 5 ms aproximadamente. Inmediatamente después se diluyó la muestra en 1 ml de SOC y se incubó durante 1 h a 37°C, permitiendo la expresión del gen de resistencia a ampicilina en las células transformadas. La mezcla de transformación se inoculó en una placa de LBA, aislándose las colonias de transformantes resistentes después de 12 h de incubación a 37°C.

### 9.3 Transformación por choque térmico.

Células *E. coli* One Shot® Top 10 (Invitrogen): se utilizaron 3 µl de reacción de clonaje para transformar una alícuota de 50 µl de células. Las células junto con el plásmido se incubaron por 30 min en hielo. Posteriormente se realizó el choque térmico de las mismas durante 30 segundos a 42°C. Se agregaron 250 µl de medio de cultivo SOC y se agitaron a 200 rpm durante 1 h a 37°C. Finalmente 100-200 µl de la mezcla de transformación se inocularon sobre placas de LBA y se dejaron incubando a 37°C, 20 h.

Células *E. coli* BL21 Star® (DE3) (Invitrogen): un vial de células (250 µl) se transformó con 2 µl del plásmido correspondiente. Después de 10 min de incubación en hielo, se realizó el choque térmico de las células durante 30 segundos a 42°C. A continuación, se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 30 min. La mezcla de transformación se inoculó en placas de LBA y se dejaron incubando a 37°C durante 20 h.

## 10. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La manipulación de DNA se llevó a cabo como se describe en Sambrook y Russel (2001). Para analizar las secuencias de DNA se utilizaron los programas y bases de datos disponibles en los siguientes servidores: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), [www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr). En la **Figura 4** podemos ver en detalle la secuencia completa del gen *pac* de la enzima PGA de *E. coli* ATCC11005.

### 10.1 Extracción de plásmidos de cepas de *E. coli*.

Según la aplicación de los plásmido clonados en *E. coli*, se emplearon diferentes métodos para su extracción. Para aplicaciones que no requerían un DNA de alta pureza, como puede ser la verificación de una construcción en un gel de agarosa, el DNA plasmídico se aisló de acuerdo con el protocolo de **lisis alcalina** descrito por Sambrook *et al.* (1989). Cuando el número de muestras a analizar era elevado se utilizó el método de extracción desde colonias en placa. Para ello, se picaba con un palillo una colonia de una placa de medio sólido y se resuspendía en 20 µl de una solución de lisozima 0.5 mg/ml, EDTA 25mM pH 8, Tris HCl 25mM pH 7.5, RNAasa 0.1 mg/ml, azul de bromofenol 0.02% (p/v) y glicerol 0.015% (v/v). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente se añadían 5 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezclaba de forma vigorosa y finalmente se centrifugaba a 16000 x g durante 2 min. Para la visualización de los plásmidos se cargaban 10 µl de la fase acuosa en un gel de agarosa, que se sometía a electroforesis de DNA convencional.

En experimentos que requerían un DNA de mayor pureza, como es el caso de la secuenciación, mutagénesis o transformación de *E. coli*, se utilizó el sistema comercial “*Wizard Plasmid Purification Kit*®” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 10.2 Precipitación de DNA.

Para concentrar y/o eliminar impurezas de las muestras de DNA, se precipitaron con un volumen de acetato sódico 3 M a pH 5 equivalente a 1/10 del volumen de la muestra, y 2 volúmenes de etanol frío. La mezcla se centrifugó a 16000 x g durante 5 min y el sedimento de DNA obtenido se lavó con etanol frío al 70% (v/v). Tras el lavado, se dejaba evaporar el etanol residual a temperatura ambiente y finalmente se resuspendía el DNA en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

1 CACCTGCCAG AGGATACA**AT** GAAAAATAGA AATCGTATGA TCGTGAAC**TG** TGTTACTGCT

```

61 TCCCTGATGT ATTATTGGAG CTTACCTGCA CTGGCTGAGC AGTCGTCAAG TGAGATAAAG
121 ATTGTTTCGCG ATGAATACGG CATGCCGCAT ATTTATGCCA ATGATACATG GCACCTATTT
181 TATGGCTATG GCTATGTAGT AGCACAAGAT CGCCTTTTTT AGATGGAAAT GGCACGTCGC
241 AGTACTCAAG GGAAGTGCCT GGAAGTGCCT GGCAAAGATT TTGTGAAATT TGATAAAGAT
301 ATCCGTCGTA ACTACTGGCC GGATGCTATC CGGGCACAA TTGCTGCCCT TTCCCCAGAG
361 GATATGTCCA TTCTGCAAGG CTACGCTGAT GGAATGAATG CCTGGACTGA TAAGGTAAAT
421 ACCAATCCAG AGACGCTCTT ACCAAAACAG TTAAATACAT TTGGCTTTAC TCCTAAGCGC
481 TGGGAACCGT TTGATGTCGC GATGATATTT GTGGGCACCA TGGCAAACCG CTTCTCTGAT
541 AGCACTAGCG AAATTGATAA TCTGGCACTG CTAACGGCTT TAAAGATAA ATATGGTGTA
601 TCACAAGGCA TGGCGGTATT TAATCAGTTG AAATGGCTGG TAAACCCATC AGCGCCAACC
661 ACTATTGCCG TACAAGAGAG TAACTACCCA CTTAAATTTA ATCAGCAAAA CTCGCAAAACA
721 GCAGCTCTGT TGCCACGCTA CGATTTACCT GCACCAATGC TTGACCGACC AGCAAAAGGG
781 GCGGATGGCG CACTGCTGGC GTTAACAGCA GGAAGAACC GGGAAACTAT TGCTGCACAA
841 TTTGCACAGG GTGGTGCCAA TGGTCTGGCG GGGTATCCAA CGACCAGCAA TATGTGGGTG
901 ATCGGCAAAA GCAAAGCCCA GGATGCAAAA GCAATCATGG TAAATGGTCC GCAGTTTGCG
961 TGGTATGCGC CTGCGTATAC TTATGGTATT GGTCTGCACG GTGCTGGTTA TGATGTCAC
1021 GGCAATACAC CATTTGCCTA TCCTGGGCTG GTTTTGGTC ATAATGGTGT GATTTCCTGG
1081 GGATCAACGG CAGGTTTCGG CGATGATGTC GATATTTTGG CTGAACGGCT CTCGGCAGAG
1141 AAACAGGCT ACTACTTGCA TAATGGTAAG TGGGTGAAAA TGTAAAGCCG TGAGGAAACC
1201 ATTACGGTGA AAAATGGTCA GCAGAGACC TTTACTGTCT GCGTACGGT GCATGGCAAC
1261 ATTCTCCAAA CTGACCAGAC GACACAAACG GCTTACGCTA AATCCCGCGC ATGGGATGGT
1321 AAAGAGGTGG CGTCTTTGCT GGCCTGGACT CATCAGATGA AGGCCAAAAA TTGGCAGGAG
1381 TGGACACAGC AGGCAGCGAA ACAAGCACTG ACCATCAACT GGTACTATGC TGATGTAAAC
1441 GGCAATATTG GTTATGTTCA TACTGGTGCT TATCCAGATC GTCAATCAGG CCATGATCCG
1501 CGATTACCCG TTCCTGGTAC GGGAAAATGG GACTGGAAAG GGCTATTGCC TTTTGAAATG
1561 AACCCTAAGG TGTATAACCC CAGTCGGGA TATATTGCTA ACTGGAACAA TTCTCCCCAA
1621 AAAGATTATC CCGCTTCAGA TCTGTTTGCC TTTTGTGGG GTGGTGCAGA TCGCGTTACG
1681 GAGATCGACCGACTGCTTGA GCAAAAGCCA CGCTTAACCTG CTGATCAGGC ATGGGATGTT
1741 ATTCGCAAA CCAGTCGTCA GGATCTTAAC CTGAGGCTTT TTTTACCTAC TCTGCAAGCA
1801 GCGACATCTG GTTTGACACA GAGCGATCCG CGTCGTCAGT TGGTAGAAAC ATTAACACT
1861 TGGGATGGCA TCAATTTGCT TAATGATGAT GGTAACACCT GGCAGCAGCC ACCGCTGCGC
1921 ATCCTGAACG TTTGGCTGAC CAGTATGTTG AAGCGTACCG TAGTGGCTGC CGTACCTATG
1981 CCATTTGATA AGTGGTACAG CGCCAGTGGC TACGAAACAA CCAGGACCG CCCAACTGGT
2041 TCGCTGAATA TAAGTGTTGG AGCAAAAATT TTGTATGAGG CGGTGCAGG AGACAAATCA
2101 CCAATCCAC AGGCGGTTGA TCTGTTTGCT GGGAAACCAC AGCAGGAGGT TGTGTTGGCT
2161 GCGCTGGAAG ATACCTGGGA GACTCTTTCC AAACGCTATG GCAATAATGT GAGTAACTGG
2221 AAAACACCTG CAATGGCCTT AACGTTCCGG GCAAATAATT TCTTTGGTGT ACCGCAGGCC
2281 GCAGCGGAAG AAACGCGTCA TCAGCGGAG TATCAAAACC GTGGAACAGA AAACGATATG
2341 ATTGTTTTCT CACCAACGAC AAGCGATCT CCTGTGCTTG CCTGGGATGT GGTGCGACCC
2401 GGTCAGAGTG GGTTTATTGC TCCCGATGGA ACAGTTGATA AGCACTATGA AGATCAGCTG
2461 AAAATGTACG AAAATTTTGG CCGTAAGTCG CTCTGGTTAA CGAAGCAGGA TGTGGAGGCG
2521 CATAAGGAGT CGCAGGAAGT GTTGCACGTT CAGAGATAAT TAAGCCCGAA AGCCCTCATA
2581 TTCTGGAGGA ATATGAGGGT

```

**Figura 4.** Secuencia del gen *pac* de PGA de *E. coli* cepa ATCC11005. Se ha destacado en negrita el codón de iniciación y el codón de terminación. La secuencia correspondiente a la subunidad  $\alpha$  aparece en azul y la subunidad  $\beta$  en rojo. En los distintos colores se han señalado los codones mutados para obtener los distintos mutantes de PGA diseñados en este trabajo. PGA8glu **XXX** PGAsup **XXX** y PGApst **XXX**

### 10.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación y visualización de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.7-2% (p/v), según el tamaño de la muestra a analizar o purificar, sumergidos en tampón TAE (Tris-HCl 40mM pH 7.5, ácido acético 4 M, EDTA 1mM pH 8). Para la migración del DNA se aplicó un voltaje de 5 V/cm y el patrón de restricción utilizado fue  $\lambda$  H+E (DNA del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI). Para la visualización de las bandas de DNA los geles se tiñeron durante 15-20 min en una solución de bromuro de etidio (5  $\mu$ g/ml) e irradiados con luz ultravioleta ( $\lambda$ = 312 nm) en un transiluminador.

#### 10.4 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.

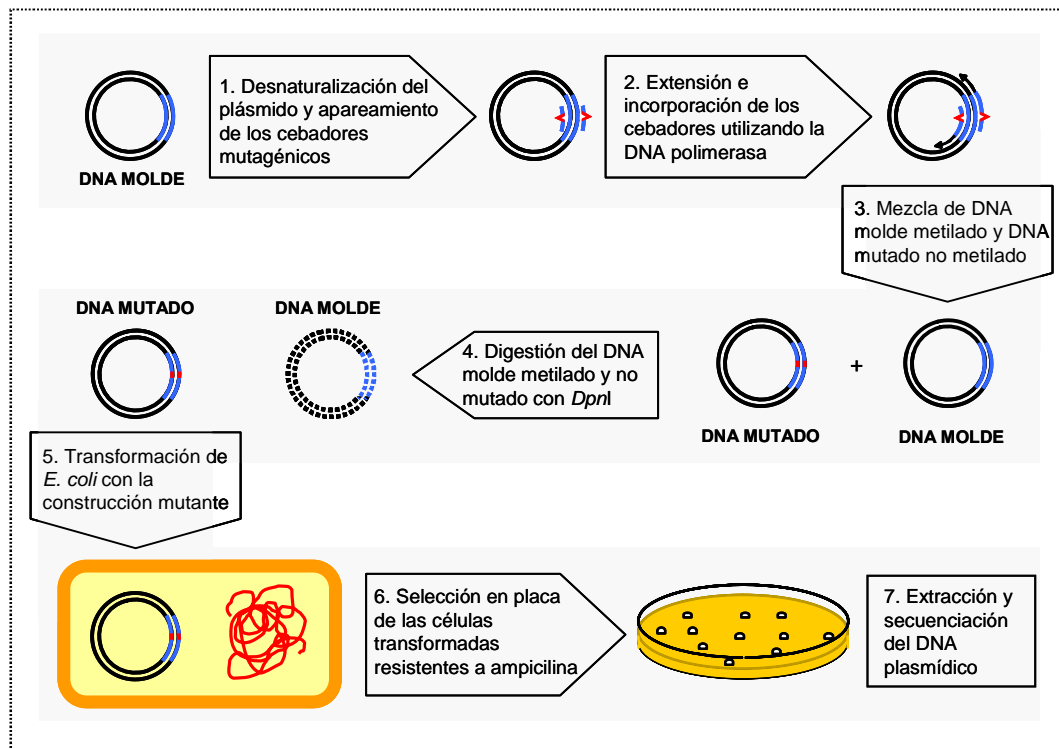
Para la extracción de DNA desde geles de agarosa se utilizó el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN). En primer lugar, se cortó la porción de gel que contenía la banda de DNA a purificar. Dependiendo del peso del fragmento de agarosa cortado, se añadió una cantidad de tampón comercial QG equivalente a 3 veces el volumen del gel cortado (100 mg  $\sim$  100  $\mu$ l). La mezcla se incubó a 50°C durante 10 min hasta la disolución total de la agarosa, y posteriormente se añadió un volumen de gel de isopropanol. La mezcla se transfirió a una columna con filtro ubicada en un tubo de 2 ml y se centrifugó durante 1 minuto a 16000 x g quedando el DNA adherido a la membrana. Se desechó el eluido, y los restos de agarosa de la columna se eliminaron mediante un lavado con 200  $\mu$ l de buffer QG. Posteriormente se añadieron 750  $\mu$ l de tampón PE con etanol y se centrifugó durante 1 min. Para eliminar los restos de etanol se realizó una centrifugación adicional. Finalmente se aplicaron 30  $\mu$ l de tampón de elución en la columna, recogándose el DNA tras 1 min de centrifugación.

#### 10.5 Mutagénesis dirigida.

Se siguieron dos estrategias de mutagénesis dirigida para obtener los distintos mutantes, dependiendo de si sólo contenían un residuo mutado (cys) o varios. En la **Figura 4** aparecen señalados en la secuencia del gen *pac* las mutaciones correspondientes a cada mutante.

##### 10.5.1 Mutantes de PGA con un solo residuo mutado.

Para los experimentos de mutagénesis en los que se quería mutar un único residuo a cisteína se siguieron las instrucciones del sistema comercial “*Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit*” Stratagene. La **Figura 5** resume la estrategia de mutagénesis dirigida utilizada. La mutagénesis consistió en la sustitución de un sólo nucleótido; para ello, se sintetizaron parejas de cebadores complementarios entre sí que incluían la mutación específica a introducir. Estos oligonucleótidos hibridaban con una región concreta del DNA molde excepto a nivel del punto de inserción de la mutación. La mutagénesis dirigida implicaba una reacción de síntesis catalizada por la DNA polimerasa *pfu* en la que los oligonucleótidos mutantes servían como cebadores del proceso.



**Figura 5.** Estrategia de mutagénesis dirigida de un solo nucleótido.

Para realizar cada mutación se realizó una reacción de amplificación utilizando el equipo Gene Amp PCR System 2400 de Perkin Elmer. Para la amplificación se preparó una mezcla de reacción que contenía 10 ng de plásmido con el gen nativo de la PGA (pAOF) (Abián, 2003), 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos mutagénicos correspondientes (oligonucleótido en sentido 5'→3' y su complementario) (**Tabla 4**), 2.5 UI de la enzima DNA polimerasa *Pfu*, el tampón proporcionado por el proveedor y deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración de 0.1 mM cada uno. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl. La mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 95°C 1 min, 18 ciclos de: 95°C 1 min, 55°C 1 min, 68°C 25 min, y finalmente 1 ciclo de 68°C 7 min.

Concluida la reacción de mutagénesis, se digirió el DNA molde de la reacción (pOAF) adicionando a la mezcla de reacción 10 UI de la enzima de restricción *DpnI*, durante un mínimo de tres h a 37°C. Esta enzima reconoce secuencias metiladas, por lo que va a dejar intactas las construcciones mutantes, no metiladas debido a su síntesis *in vitro*, y va a degradar el DNA molde, clonado *in vivo* y por lo tanto metilado. Una vez realizada la digestión, se clonaron las construcciones mutantes en células quimiocompetentes Top 10 de *E. coli* (Stratagene), verificándose las mutaciones introducidas por secuenciación.

Tras el análisis de la superficie de la PGA y en los resultados de simulación por dinámica de enfriamiento lento, se eligieron los siguientes residuos para su mutación puntual a cisteína: ThrB107Cys y ThrB278Cys, empleando los oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 4**. Se obtuvieron así los plásmidos pPGAB107cys y pPGAB278cys.

#### 10.5.2 Mutantes de PGA con más de un residuo mutado.

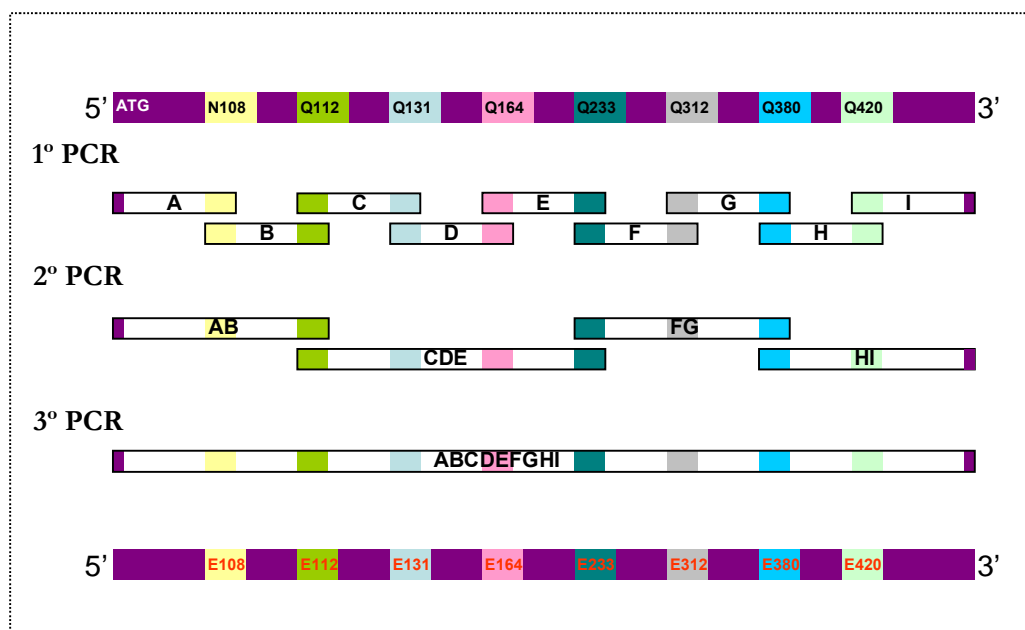
En el caso de los mutantes de PGA con más de un residuo mutado se prefirió seguir como estrategia de mutagénesis dirigida la amplificación de fragmentos que solapan por PCR (Ho *et al.*, 1989) en lugar de realizar las mutaciones independientemente. Se obtuvieron por esta metodología 3 mutantes de PGA. A continuación se detalla el diseño de cada mutante.



### A. Mutante de PGA enriquecido en 8 glutámicos (PGA8glu).

La **Figura 6** muestra la estrategia seguida para la obtención del mutante PGA8glu. Las 8 mutaciones (Asn/Gln por Glu) se introdujeron en 3 pasos de PCR. En un primer lugar, se amplificaron nueve fragmentos que abarcaban todo el gen *pac* y contenían todas las mutaciones propuestas. Se obtuvieron los fragmentos A;B;C;D;E;F;G;H e I.

El plásmido pOAF que contenía el gen *pac* clonado (Abián, 2003) se empleó como DNA molde en todas las reacciones de la 1ª ronda de PCR (**Tabla 5**). En segundo lugar, estos fragmentos se purificaron por gel de electroforesis y se unieron en pares o tripletes en una segunda ronda de PCR dando lugar a 4 nuevos fragmentos: fragmento AB; CDE; FG y HI. Estos fragmentos se purificaron por gel de electroforesis y se unieron para dar lugar a un único fragmento ABCDEFGHI en la tercera ronda de PCR. Este fragmento contenía las 8 mutaciones deseadas y se purificó por gel de electroforesis para poder ser clonado en el vector pET101/ D-TOPO.



**Figura 6.** Diseño del mutante PGA8glu. En la primera ronda de PCR se obtuvieron los fragmentos. A; B; C; D; E; F; G; H; I. En la segunda ronda de PCR se obtuvieron los fragmentos: AB; CDE; FG; HI. En la tercera ronda de PCR se obtuvo un único fragmento ABCDEFGHI que contenía todas las mutaciones deseadas. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4.

PCR 1			PCR 2			PCR 3		
Fragmento	Cebadores		Fragmento	Cebadores		Fragmento	cebadores	
A	Topo 5'	1b	AB	Topo5'	2b	ABCDEFGHI	Topo5'	Topo 3'
B	1a	2b	CDE	2a	5b			
C	2a	3b	FG	5a	7b			
D	3a	4b	HI	7a	Topo 3'			
E	4a	5b						
F	5a	6b						
G	6a	7b						
H	7a	8b						
I	8a	Topo3'						

**Tabla 5.** Fragmentos obtenidos en cada ronda de PCR y los cebadores empleados de la Tabla 3.

### **B. Mutante de PGA enriquecido en residuos nucleófilos en la zona superior respecto al centro activo (PGAsup).**

Mutante de PGA que contiene 6 mutaciones introducidas en la zona superior respecto al centro activo de la proteína, una vez establecidos los ejes de referencia. La estrategia para obtener este mutante es similar a la del mutante anterior PGA8glu realizando sucesivas rondas de PCR en las que se obtienen los distintos fragmentos que contienen las mutaciones deseadas.

### **C. Mutante de PGA enriquecido en residuos nucleófilos en la zona posterior respecto al centro activo (PGApst).**

Mutante de PGA que contiene 7 mutaciones introducidas en la zona posterior respecto al centro activo de la proteína, una vez establecidos los ejes de referencia. La estrategia para obtener este mutante es similar a la del mutante anterior PGA8glu realizando sucesivas rondas de PCR en las que se obtienen los distintos fragmentos que contienen las mutaciones deseadas.

Para la amplificación de los fragmentos de DNA mediante PCR se preparó una mezcla de reacción que contenía el DNA molde (plásmido o fragmento según el caso), una pareja de oligonucleótidos a una concentración de 0.5  $\mu$ M cada uno, 2.5 U de la DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene), el tampón comercial *pfu* 10X y dNTPs a una concentración de 0.1 mM cada uno. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50  $\mu$ l. La mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de amplificación: 1 min a 95°C, 30 ciclos de: 95°C 1 min, 55°C 1 min, 68°C 2,5 min por kb del fragmento de mayor tamaño, y finalmente 15 min a 68°C para permitir la terminación de las cadenas que hubieran quedado incompletas en los ciclos anteriores. Los distintos fragmentos de ADN obtenidos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa y purificados con el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction*”.

#### 10.6 Clonación en el vector de expresión pet101/D-TOPO®.

El fragmento de 2620 pb correspondiente al gen de la PGA con las mutaciones introducidas en cada caso, se clonó en el vector de expresión direccional pET101/D-TOPO (**Figura 1**). El oligonucleótido TOPO 5' (**Tabla 4**) se diseñó según las indicaciones del proveedor para lograr el clonaje direccional del fragmento. En este sistema, los productos de PCR son clonados de forma direccional al adicionar cuatro pares de bases (CACC) en el oligonucleótido de clonación 5'-3' (TOPO 5'). De esta manera el extremo saliente del vector (GTGG) invade el extremo 5' del producto de PCR, hibrida con las bases adicionadas, y estabiliza el producto de PCR en la dirección correcta **Figura 7**. Se siguieron las instrucciones del *kit* para la reacción de clonaje utilizando 2  $\mu$ l del DNA amplificado (gen *pac*) y 1  $\mu$ l de vector. El volumen final de la mezcla fue 5  $\mu$ l. La mezcla de reacción se incubó 5 min a temperatura ambiente y 30 min en hielo.

#### 10.7 Cuantificación de DNA plasmídico.

La cuantificación del DNA plasmídico empleado para la transformación de *E. coli* se realizó en espectrofotómetro a una DO<sub>260</sub> considerando que 1 unidad de absorbancia a esa longitud de onda equivale a una concentración de 50  $\mu$ g/ml de DNA de doble hebra. La cuantificación de DNA se llevó a cabo a partir de una dilución 1:100 en agua de los plásmidos extraídos por el método *wizard*.

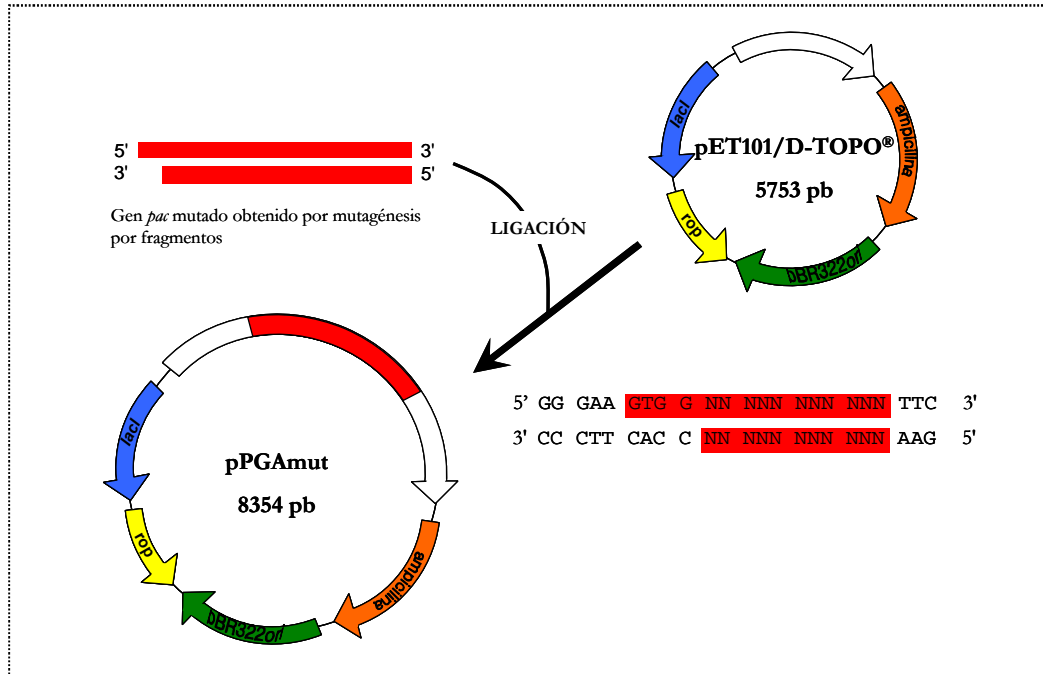


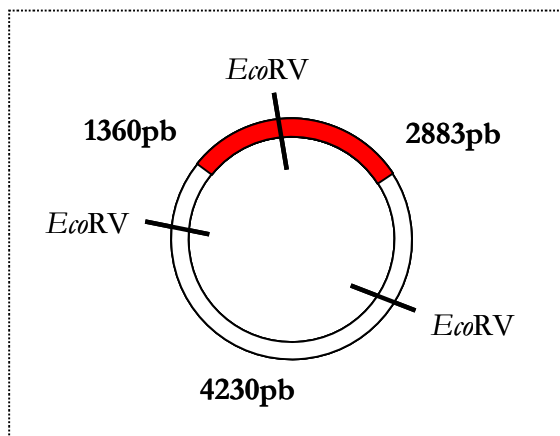
Figura 7. Clonaje direccional en vector de expresión pET101/D-TOPO.

### 10.8 Selección de transformantes. Análisis de restricción con *EcoRV*.

Se buscaron los clones en los que el tamaño del DNA plasmídico coincidiese con 8373 pb (5753 pb del plásmido + 2620 pb del gen *pac*). Como el número de muestras era elevado se utilizó un método de extracción de plásmidos desde colonias en placa mediante el protocolo de lisis alcalina (*Métodos 9.1*).

Una vez seleccionados los clones con el tamaño correcto, se realizó un análisis de restricción utilizando la enzima *EcoRV* para verificar si el gen *pac* se insertó en el vector en la orientación correcta. Las digestiones de DNA con *EcoRV* (1 U/ $\mu$ g) se llevaron a cabo durante 2 h a 37°C. La **Figura 8** muestra el análisis de restricción para la enzima. Esta enzima corta a los 545pb y 4775 pb en el caso del vector, y a los 282 pb del inicio del gen *pac*. Si la orientación del inserto es correcta se obtienen tres fragmentos de 4230, 2883 y 1360 pb tras la digestión con *EcoRV*. Ninguna de las mutaciones introducidas en los distintos mutantes modificó el perfil de restricción.

De aquellos clones que cumplen con este patrón de restricción, se aisló su DNA plasmídico para secuenciación con el sistema comercial "Wizard Plasmid Purification Kit®".



**Figura 8.** Mapa de restricción con *EcoRV* del pOAF que contiene el gen *pac* clonado en el vector pET/TOPO D101. El patrón de restricción es similar para el resto de los mutantes realizados.

### 10.9 Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo Abi Prism 3700™ (Applied Biosystems).

## 11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y PURIFICACIÓN. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS.

### 11.1 Fermentación de PGA nativa y mutantes en *E. coli* BL21.

Se inoculó un precultivo de 40ml de medio LB con ampicilina 150 µg/ml (LBA) con una colonia *E. coli* BL21 transformada con el plásmido de interés (PGA nativa o mutadas). El precultivo se incubó en agitación a 220 rpm a 22°C. Tras 24 h este precultivo se empleó para inocular 1 L de medio fresco LBA. El cultivo se indujo con 0.1 mM IPTG después de alcanzar una  $DO_{600} \sim 0.6$  ya que la expresión está bajo el control del promotor T7. Tras la inducción, se incubó durante 48 h más a 22°C. Posteriormente, se recogieron las células por centrifugación (10000 x g, 5 min) y el pellet se resuspendió en una relación de 10 ml fosfato de sodio 20 mM pH 7.0/g de célula. Esta suspensión se sonicó a 4°C durante 10 ciclos de 7 s a 40% de intensidad empleando “Sonicator Ultrasonic Procesor” de Misomix. Una vez sonicado se separó la fracción insoluble por centrifugación (20000 x g, 20min) a 4°C de nuevo y el sobrenadante se conservó a 4°C para su posterior tratamiento. En el **Figura 9**, se resume el proceso de obtención de la PGA.

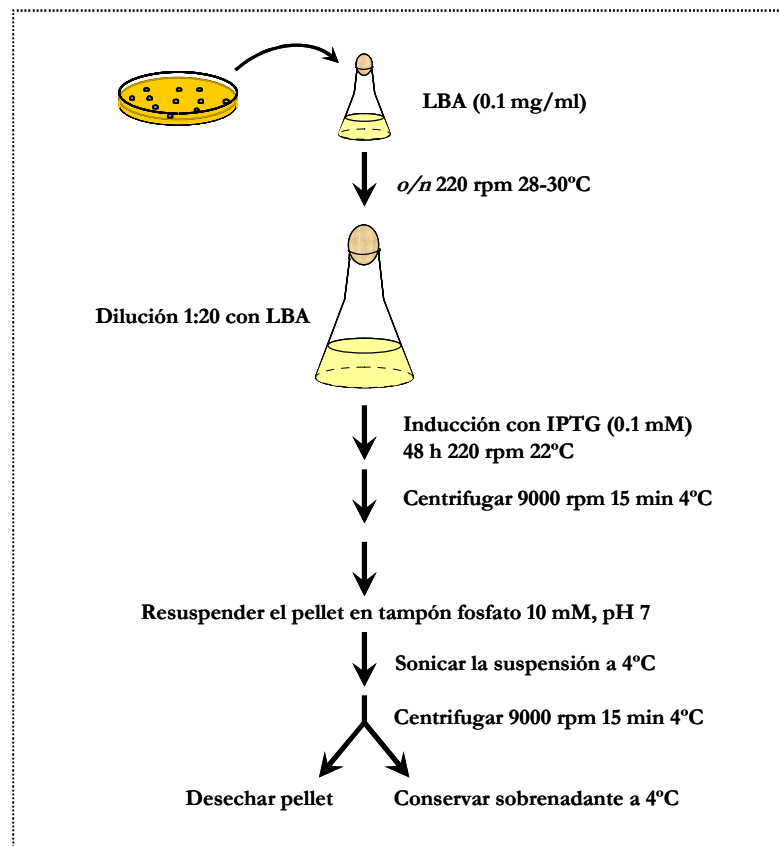


Figura 9. Protocolo de fermentación de PGA nativa y mutantes en *E. coli* BL21.

## 11.2 Purificación de PGA nativa y mutantes.

El protocolo utilizado de purificación consistió en tres etapas:

**1° Precipitación con sulfato de estreptomicina.** Se precipitó el DNA del extracto al agregar 2.0 % (p/v) de sulfato de estreptomicina (Schütz *et al.*, 2003). Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se centrifuga a 4°C durante 15 min a 20000 x g y se descarta el precipitado.

**2° Cromatografía de intercambio iónico agarosa-PEI 25kDa.** Una vez obtenido el extracto sin DNA se dializa frente a tampón bicarbonato de sodio 50 mM pH 8.5. A continuación, alícuotas de 30 ml del extracto dializado se incuban con 10 g de agarosa-PEI 25 kDa (Mateo *et al.*, 2000b). La mezcla se agitó suavemente en *batch* a 4°C

durante 4 h. Finalmente se recuperó el sobrenadante por filtración en placa. La actividad de la PGA o de los distintos mutantes se encuentra en el sobrenadante ya que no se adsorben a esta matriz iónica.

**3° Cromatografía de intercambio iónico Q-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences).** Se purificó el extracto anterior conteniendo la enzima mediante FPLC. Se empaquetó una columna de 70 cm de alto y 1 cm de diámetro interno. En un primer paso se equilibró a un flujo 1 ml/min con 100 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.5. Después se procedió a la carga del sobrenadante del paso anterior (máximo 25 ml). Posteriormente se pasaron nuevamente por la columna 100 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.5 a un flujo de 1ml/min. Por último se procedió a eluir la enzima adsorbida al soporte empleando un gradiente de 0-100 mM NaCl en Tris-HCl 50 mM pH 8.5 (flujo 1 ml/min), y se recogieron fracciones de 3 ml. Se detectaron las proteínas presentes en cada fracción por espectrofotometría UV a  $\lambda = 280$  nm.

La PGA nativa y todos los mutantes obtenidos en este trabajo se purificaron por este método excepto el mutante PGA8glu que fue directamente purificado por Q-Sepharosa-FPLC tras la precipitación del DNA. Se eluyó con un gradiente de 0-200 mM NaCl en Tris-HCl 50 mM pH 8.5 (flujo 1 ml/min).

Las fracciones de mutantes puros de PGA a las que se les introdujo un residuo de cisteína (PGAcysB107 y PGAcysB278), se redujeron con DTT 50 mM antes de su uso. El exceso de agente reductor fue eliminado en columnas de Sephadex G-25.

### **11.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

Las electroforesis se realizaron según la técnica descrita por Laemmli (1970). Las muestras para electroforesis sean en ml o g de derivado enzimático fueron mezcladas con un volumen de tampón de carga [Tris-HCl 190 mM pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 3% (p/v), SDS 6% (p/v), azul de bromofenol 40mg/l, glicerol 30% (v/v)]. Las muestras se incubaron durante 5 min en un baño en ebullición y centrifugadas a 16000 x g durante 5 min. Para la electroforesis en condiciones desnaturalizantes se empleó el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (100x75x1 mm) al 12% y 0.1% (p/v) de SDS. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de corriente constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25mM pH 8.8, glicina 190 mM y SDS 1%. Se utilizó para el revelado el colorante azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971) Como marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad) se utilizaron:

fosforilasa b (97.4 KDa), seroalbúmina bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa) e inhibidor de tripsina (21.5 KDa).

#### **11.4 Determinación del punto isoelectrico (isoelectroenfoque).**

La determinación del punto isoelectrico se realizó mediante el sistema Phast System de Pharmacia en un PhastGel® IEF Ph 3-9 (0.35 mm de grosor, tamaño: 5x 4 cm, 5% T y 3% C). Las condiciones a las que se sometió el gel fueron 2000 V, 2.5 Ma y 3.5 W a 15°C hasta que se alcanzaron los 410 V/h. Se cargó 1 µl de muestra (0.150 mg/ml). El gel se tiñó con Coomassie como colorante siguiendo las indicaciones del proveedor y se estimaron los puntos isoelectricos de la PGA nativa y mutantes desde la posición relativa de las mismas en el gel con respecto a las proteínas estándar (Olsson *et al.*, 1988).

#### **11.5 Determinación de la concentración de proteína.**

La cantidad de proteína fue determinada utilizando el método de Bradford usando albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976).

### **12. PREPARACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN.**

#### **12.1 Soportes agarosa glioxil.**

Los soportes agarosa glioxil 10BCL fueron preparados por eterificación de la agarosa según el protocolo descrito por Guisán (1998).

El paso que determina la cantidad de grupos glioxil que se desean obtener viene determinado por la cantidad de periodato añadido, sabiendo que por cada mol de NaIO<sub>4</sub> obtenemos 1 mol de aldehído. En este caso se obtuvieron 200 µmol de aldehídos/ml de soporte, es decir, una activación del 100% de los grupos existentes.

#### **12.2 Soportes agarosa polietilenimina (PEI).**

Los soportes de agarosa recubierta de polietilenimina (PEI) se prepararon a partir de geles agarosa glioxil 4BCL como está descrito en la literatura (Mateo *et al.*, 2000b).



### 12.3 Soportes agarosa dextrano sulfato (DS).

Los soportes de agarosa recubierta con dextrano sulfato se prepararon a partir de agarosa MANAE (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993) siguiendo el protocolo descrito por (Fuentes *et al.*, 2004a).

### 12.4 Soportes Eupergit-tiol.

Los soportes Eupergit C bifuncionales tiol-epóxido se sintetizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Grazú (2003). Los soportes parcialmente tiolados fueron guardados a 4°C en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 hasta su uso. También se sintetizaron los soportes control en los que la unión transcurre exclusivamente por el intercambio tiol-disulfuro donde los grupos epóxido son bloqueados con glicina.

Ambos soportes bifuncional y control se activación con 2-PDS. Alícuotas de 10 g de cada uno de los soportes parcialmente tiolados obtenidos con Na<sub>2</sub>S y de sus respectivos soportes control, se incubaron con 40 ml de una mezcla acetona-agua (60:40, v/v) y 60 ml de una solución de 2-PDS 0.3 M en acetona-50 mM bicarbonato de sodio (60:40, v/v) (Carlsson *et al.*, 1975). La activación se llevó a cabo durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación suave. Después el soporte fue filtrado en placa filtrante y lavado con una mezcla acetona-agua (60:40, v/v), y finalmente con una solución 1mM EDTA. Los soportes activados fueron guardados a 4°C en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0.

## 13. PROTOCOLOS DE INMOVILIZACIÓN.

En todos los casos, el curso de inmovilización se controló por medida de la actividad del sobrenadante a diferentes tiempos.

Las suspensiones de referencia se prepararon teniendo exactamente la misma concentración de enzima, condiciones de medio (pH, T, fuerza iónica) y añadiendo la cantidad correspondiente de soporte inerte en lugar del soporte activado. La actividad enzimática en el sobrenadante de estas soluciones de referencia se mantuvo en todos los casos; por lo tanto, el descenso de actividad en el sobrenadante de la “suspensión de inmovilización” puede correlacionarse directamente con la cantidad de enzima inmovilizada en el soporte.

### **13.1 Inmovilización irreversible por unión covalente.**

#### **13.1.1 Inmovilización sobre Sepharosa 4B activada con BrCN.**

Un gramo de Sepharosa 4B-BrCN (Amersham Biosciences) activada (preparada según indicaciones del proveedor) se incubó con 10 ml de solución de enzima (0.1 mg/ml) en 25 mM de fosfato de sodio pH 7.5 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Después, el derivado se filtró y se lavó con 25 mM de fosfato de sodio pH 7.5. Se bloquearon los grupos BrCN remanentes durante 2 h con 10 ml de etanolamina 1 M pH 8.0 en agitación suave. Finalmente los derivados enzimáticos se filtraron y lavaron con 25 mM de fosfato de sodio a pH 7.0. La actividad enzimática y concentración de proteínas en suspensión, sobrenadante y blanco, se cuantificaron de acuerdo con los métodos descritos previamente.

#### **13.1.2 Inmovilización sobre agarosa glioxil.**

El protocolo de inmovilización se llevó a cabo como se describe en (Alvaro, 1988; Blanco *et al.*, 1989) Se suspende 1 ml de agarosa glioxil en tampón bicarbonato 100mM, ácido fenilacético 100mM y glicerina al 25% (pH 10.05) y se añade el volumen de enzima necesaria para la cantidad que queremos inmovilizar (10UI/ml de soporte). La relación  $V_{\text{soporte}}/V_{\text{total}}$  será 1/10. Se deja incubando 3 h en agitación suave, temperatura ambiente y manteniendo el pH constante a 10.05. Posteriormente se redujo con borohidruro de sodio (1 mg/ml de reacción) durante 30 min. Los derivados se filtraron y lavaron abundantemente con agua destilada. Finalmente se lavaron con un tampón fosfato 25 mM pH 7.0 y se guardaron a 4°C.

#### **13.1.3 Inmovilización sobre Eupergit C.**

Alícuotas de 4 ml (40 UI/ml) de solución de enzima en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 fueron incubadas con 1 g de Eupergit-C prelavado con agua destilada. La mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente. Periódicamente se extrajeron muestras del sobrenadante para determinar la actividad enzimática. Finalmente, el derivado enzimático insoluble obtenido se lavó con tampón fosfato 25 mM pH 7.0.

#### **13.1.4 Inmovilización sobre Eupergit-tiol.**

Alícuotas de 10 ml (20 UI totales) de PGA con grupos tiol (PGAcysB107, PGAcysB78, PGAsup, PGApst) en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, fueron incubadas con 1 g de soporte 5  $\mu$ mol SH/epóxido-Eupergit. La mezcla fue agitada suavemente a temperatura ambiente. Periódicamente se extrajeron muestras de sobrenadante, a las cuales se les determinó actividad enzimática. Finalmente, el derivado enzimático insoluble obtenido se lavó con tampón fosfato 25 mM pH 7.0.

Tras esta inmovilización, los derivados enzimáticos obtenidos en los apartados anteriores **11.1.3** y **11.1.4**, excepto los derivados control, fueron incubados a pH 10.0 durante 48 h y a 25°C. Esta incubación adicional, se realizó para permitir la reacción entre los grupos epóxido presentes en el soporte y los grupos nucleófilos de la enzima previamente inmovilizada por intercambio tiol-disulfuro. En el caso de la enzima PGA cuando se utilizaron pH de incubación alcalinos, se agregó a la suspensión ácido fenilacético 100 mM y 20% de glicerina (v/v), para así evitar una posible inactivación enzimática (Rosell *et al.*, 1995).

#### **13.2 Inmovilización reversible por adsorción a intercambiadores iónicos.**

Como método general, 1 g de soporte (agarosa DEAE/agarosa-PEI/agarosa-CM/agarosa-DS) se añadió a 4 ml de solución de enzima (10 UI) en fosfato de sodio 5 mM a distintos pH a 25°C. En algunos casos la inmovilización se llevó a cabo en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Durante la adsorción, se tomaron muestras del sobrenadante y de la suspensión y se determinó la actividad enzimática según el método anteriormente descrito.

#### **13.3 Combinación de inmovilización reversible e irreversible.**

##### **13.3.1 Adsorción de PEI sobre derivados agarosa glioxil.**

Los derivados glioxil agarosa (10UI/g de soporte) se incubaron en una solución de 20% (v/v) de PEI (25, 60, 600 kDa) en 25 mM de fosfato de sodio pH 7.0. La suspensión se agitó suavemente durante 2 h y posteriormente se lavó con 25 mM de fosfato de sodio pH 7.0. Los derivados se filtraron y se guardaron a 4°C hasta su uso.

### **13.3.2 Coinmovilización de enzima y PEI sobre soportes agarosa glioxil.**

La enzima se inmovilizó sobre soportes glioxil a 25°C como se ha descrito anteriormente (Métodos **12.1.2**). Toda la enzima ofrecida se inmovilizó sobre el soporte en menos de 30 min, pero la reacción se mantuvo durante 3 h y después se añadió una solución de PEI 25, 60 ó 600 kDa al 20% (v/v). Tras 30 min bajo agitación suave a 25°C, los derivados enzimáticos se redujeron añadiendo 1 mg de NaBH<sub>4</sub> sólido por ml de suspensión. Después de 30 min, los derivados se filtraron y lavaron extensamente con agua destilada. Los derivados enzimáticos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### **13.3.3 Entrecruzamiento con glutaraldehído de las enzimas adsorbidas**

Una vez obtenidos los derivados enzimáticos con la enzima adsorbida sobre soportes de agarosa-PEI como se ha descrito en Métodos **12.2** se incubaron en una solución 0.5% (v/v) de glutaraldehído en 25 mM de fosfato de sodio a pH 7.0 y 25°C durante 1 h, bajo agitación suave. Este tratamiento permitió modificar totalmente los grupos amino primarios de la enzima y el soporte con una única molécula de glutaraldehído (Monsan, 1978; Fernández-Lafuente et al, 1995b).

Posteriormente se filtraron los derivados y se lavaron con 25 mM de fosfato de sodio a pH 7 para eliminar el exceso de glutaraldehído. Después, se incubaron por un periodo adicional de 20 h a 25°C para lograr un entrecruzamiento más intenso entre la enzima y el soporte.

## **14. ESTUDIO DE LA FUERZA DE UNIÓN DE LA ENZIMA A SOPORTES IÓNICOS.**

Los distintos derivados enzimáticos de PGA sobre intercambiadores iónicos (10UI/g de soporte) se incubaron en concentraciones crecientes de NaCl a 25°C, en tampón fosfato 5 mM a pH 7.0. Después de 30 min (periodos más largos de tiempo no revelaron cambios en el resultado) se determinó la actividad penicilina acilasa en el sobrenadante.

## **15. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS.**

La estabilidad se expresa como la vida media de cada derivado enzimático en las condiciones de incubación. El factor de estabilización se calcula como la razón entre las vidas medias del derivado de referencia o partida y el derivado en estudio.

### **15.1 Estabilidad térmica.**

Los derivados enzimáticos se incubaron a diferentes temperaturas en condiciones de pH, fuerza iónica y concentración que se detallan en los pies de figuras en cada caso. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática residual como se ha descrito previamente. La actividad PGA residual se expresó como porcentaje de la actividad inicial a un determinado tiempo de incubación.

### **15.2 Estabilidad frente a codisolventes.**

Los derivados enzimáticos fueron equilibrados previamente en la mezcla correspondiente tampón-codisolvente (4°C) en las condiciones que se detallan en los pies de figuras. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática residual como se ha descrito previamente. La actividad PGA residual se expresó como porcentaje de la actividad inicial a un determinado tiempo de incubación.

## **16. INHIBICIÓN POR CODISOLVENTES.**

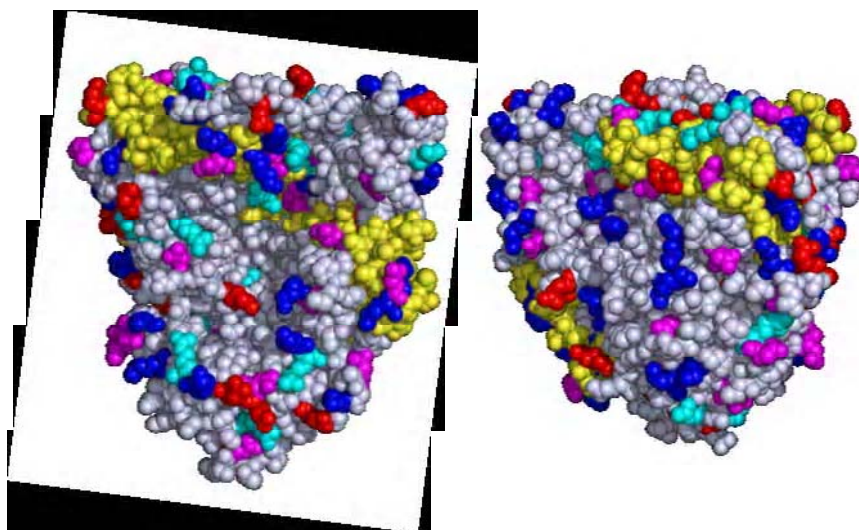
Los derivados enzimáticos se incubaron en concentraciones crecientes de dioxano. La actividad enzimática se evaluó por valoración potenciométrica con pH stat (DL 50 Mettler Toledo) para valorar la liberación de ácido mandélico producido por la hidrólisis de 10 mM (R)-(-)-mandelato de metilo en 0.1 M de fosfato de sodio a 25°C. Una solución de 100 mM NaOH se empleó como agente valorante. La actividad relativa se expresó como porcentaje de actividad relativo a la actividad en ausencia de codisolvente.

# RESULTADOS

---

---

## 1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE LA PENICILINA G ACILASA DE *E. coli* CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO.

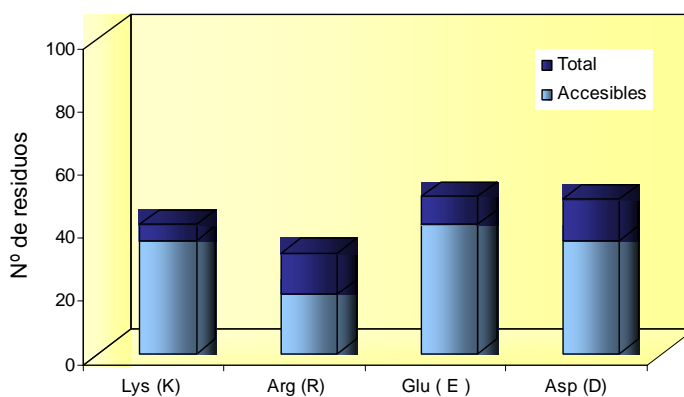


**Figura 1.** Estructura tridimensional de la Penicilina G acilasa de *E. coli*. Número de acceso del PDB **1AI4**. Lisinas: ●, argininas: ●, glutámicos: ● y aspárticos: ●. La cadena  $\alpha$  de la PGA está en amarillo. Representación obtenida en Pymol 0.99rc6.

### 1.1 Análisis de los residuos susceptibles de modificación.

La primera modificación que se realizó sobre la superficie de la Penicilina G acilasa (PGA) de *E. coli* fue la introducción de grupos carboxilo químicamente. La modificación de grupos los aminos primarios mediante su reacción con anhídrido succínico da lugar a especies modificadas estables, que tendrán carga negativa a valores de pH por encima del pKa de los grupos introducidos (*Introducción* Figura 9) (Klotz, 1967). La reacción se llevó a cabo como se ha descrito en *Material y Métodos* **6.2**.

La **Figura 1** muestra la distribución de los residuos lys, arg, glu y asp en la superficie enzimática, siendo éstos los grupos ionizables más abundantes en la superficie de las proteínas. La PGA presenta un total de 55 grupos catiónicos accesibles al medio de los cuales, solamente 36 corresponden a lisinas (**Figura 2**). Estos residuos son los únicos capaces de reaccionar con anhídrido succínico ya que las argininas no se succinilan bajo las condiciones elegidas. El anhídrido succínico tan sólo será capaz de reaccionar con los grupos amino primario expuestos y accesibles al medio.



**Figura 2.** Número de residuos ionizables en la PGA. En azul claro se muestra la fracción que corresponde a los residuos expuestos al medio con respecto al total de cada grupo. Los residuos expuestos al medio son los susceptibles a ser modificados químicamente.

## 1.2 Caracterización de la PGA succinilada.

### 1.2.1 Control del grado de succinilación química.

La **Tabla 1** recoge los resultados de la modificación química de la PGA empleando diferentes relaciones molares de anhídrido succínico/ grupos amino primario de la proteína (suma total de lisinas). Para facilitar la cuantificación de los grupos modificados se realizó una inmovilización de la enzima sobre el soporte agarosa-BrCN. Este derivado sería análogo a tener la enzima soluble ya que esta inmovilización tan sólo involucra el amino terminal de la proteína (Lundovskikh *et al.*, 1998). Como se puede apreciar, se han obtenido distintos grados de modificación variando tan sólo el exceso molar de reactivo. Así por ejemplo, se modifican un 40% de los grupos aminos con una relación 1:1. Se alcanzó un porcentaje de modificación de más de un 95% utilizando un exceso 10 M, resultado similar al que se obtuvo tras emplear un exceso 20 M. Por lo tanto, podemos asumir que estas dos últimas condiciones permiten la modificación total de todos los grupos aminos de la superficie de la proteína y a partir de ahora todos los experimentos se estandarizarán utilizando una concentración 10 M de agente modificante.

La enzima succinilada con la que se obtiene un 40% de lisinas se denominó PGA-suc-40 y PGA-suc-100 cuando se ha logrado el 100% de modificación de las lisinas expuestas.



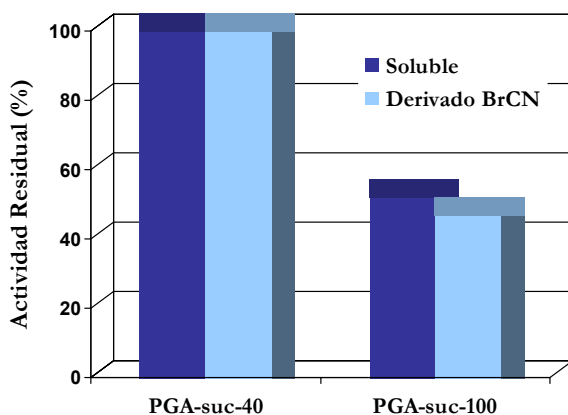
Relación Molar*	Grado de modificación (%)	Nº de grupos carboxilo introducidos
1: 1	40	14
10: 1	95	34
20: 1	100	36

**Tabla 1.** Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de la PGA de *E. coli* expuestos al medio. PGA nativa inmovilizada sobre agarosa BrCN y después succinilada. \*Relación Molar: anhídrido succínico con respecto al número de residuos de lys expuestos. El porcentaje de modificación se determinó mediante TNBS (*Material y Métodos*, 7.3)

Por lo tanto, se ha conseguido incrementar así el número de cargas negativas superficiales de 77 a 91 (asp, glu y lys succiniladas) en el caso de la PGA-suc-40 y un incremento aún mayor en el caso de la PGA-suc-100 pasando de 77 a 113 de cargas negativas.

### 1.2.2 Efecto de la succinilación en la actividad catalítica.

Se estudió también el efecto de la modificación química sobre la actividad de la enzima. Como muestra la **Figura 3**, el efecto de la succinilación sobre la actividad de la enzima PGA-suc-40 es inapreciable ya que tras el proceso de modificación se mantiene el 100% de la actividad inicial. Sin embargo, se observa una pérdida de actividad del 50% en el caso de la PGA-suc-100. Se obtienen resultados similares tanto con las enzimas solubles como en la enzima inmovilizada a través de su amino terminal sobre agarosa-BrCN y después modificada químicamente, lo cual indica que el proceso de modificación en fase sólida es equivalente al realizado en solución.

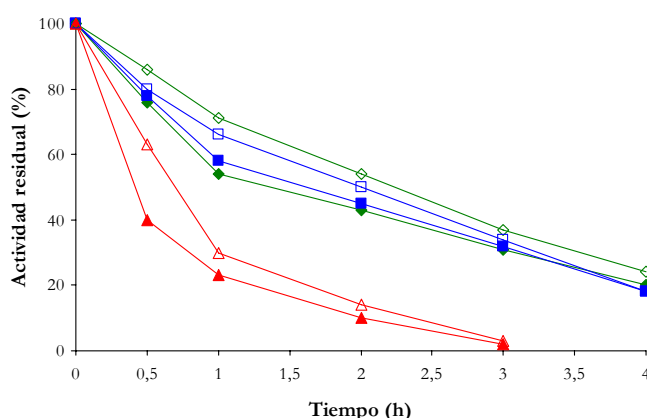


**Figura 3.**

Efecto de la succinilación de la PGA en la actividad catalítica en la enzima soluble y en la inmovilizada sobre agarosa-BrCN. PGA-suc-40: 1:1 de anhídrido succínico/ grupos amino accesibles. PGA-suc-100: 10:1 anhídrido succínico/ grupos amino accesibles. Actividad inicial 15 UI/ml (1.2 mg/ml). La actividad residual se expresa como porcentaje respecto a la actividad inicial de la enzima antes de la modificación

### 1.2.3 Efecto de la succinilación en la estabilidad térmica de la PGA.

La modificación química de proteínas puede afectar a la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína; por ello se ha querido estudiar el efecto que tiene la succinilación en la estabilidad térmica de la enzima. Como muestra la **Figura 4**, la enzima PGA-suc-40 presenta una estabilidad similar que la enzima sin modificar, tanto en su forma soluble como en el caso de la inmovilización sobre agarosa-BrCN. Como se ha comentado anteriormente, en este tipo de derivado la enzima está tan sólo unida al soporte a través del amino terminal, por lo tanto tendría un comportamiento similar al de la enzima soluble. En el caso de la PGA-suc-100 se observa una menor estabilidad tanto en la forma soluble de la enzima modificada como en la inmovilizada, disminuyendo en un factor de 2-2.5 veces la estabilidad con respecto a la enzima sin modificar.



**Figura 4.** Curso de inactivación térmica de las distintas PGAs succiniladas y la PGA sin modificar. Enzimas solubles: (◆) PGA nativa; (▲) PGA-suc-100; (■) PGA-suc-40. Enzimas inmovilizadas sobre agarosa BrCN y después succiniladas: (◇) PGA nativa; (△) PGA-suc-100; (◼) PGA-suc-40. La inactivación se realizó a 57°C en tampón fosfato 25mM, pH 7.0. Actividad residual (%): se expresa con respecto a la actividad al inicio de la inactivación. Actividad inicial de 12UI/ml.

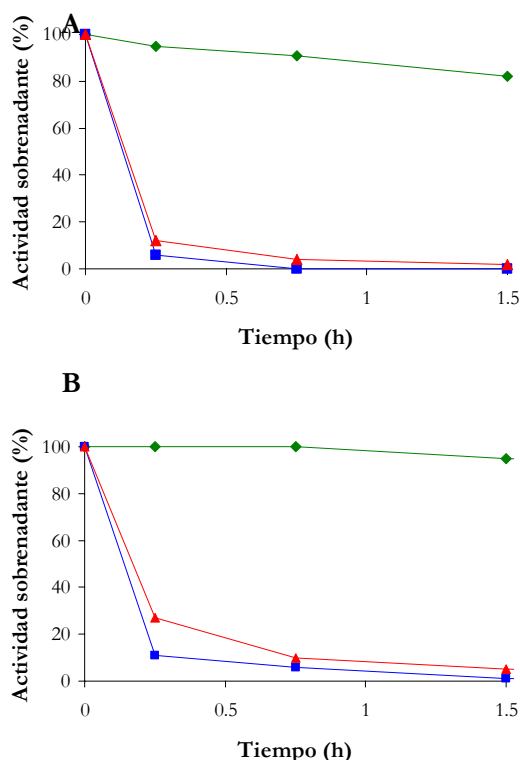
### 1.3 Inmovilización reversible de la PGA succinilada sobre intercambiadores aniónicos.

Tras aumentar significativamente el número de residuos con carga negativa en la superficie enzimática tras la modificación química, se estudió el proceso de inmovilización de estas nuevas especies modificadas sobre distintos intercambiadores iónicos. Se inmovilizaron sobre dos tipos de intercambiador aniónico: agarosa DEAE (soporte común

utilizado en cromatografía) y el soporte agarosa-PEI (soporte desarrollado en nuestro laboratorio en el que se recubre la agarosa con el polímero iónico polietilenimina, PEI) (Mateo *et al.*, 2000b; Torres *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Cinética de inmovilización sobre DEAE agarosa y PEI agarosa.

Como se puede observar en la **Figura 5A y 5B**, la PGA nativa sin modificar no se adsorbe significativamente sobre ninguno de los dos intercambiadores. En cambio, la enzima modificada, sea total (PGA-suc-100) o parcialmente (PGA-suc-40), logra adsorberse rápidamente (en menos de 30 minutos) sobre ambos soportes, manteniendo su actividad intacta durante y tras la adsorción.



**Figura 5.**

Curso de inmovilización sobre DEAE agarosa (A) y PEI 25kD agarosa (B) de las distintas PGAs succiniladas y la PGA sin modificar. (♦) PGA nativa; (▲) PGA-suc-100; (■) PGA-suc-40. La inmovilización se realizó en tampón fosfato 25mM, pH 7.0 a 25°C. Actividad residual (%): se refiere al porcentaje de actividad que queda en el sobrenadante. Actividad inicial de 25UI/ml.

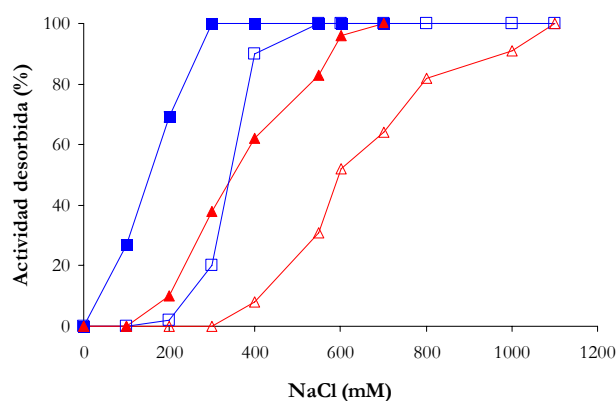
### 1.3.2 Estudio de la fuerza de unión al soporte.

Tras lograr la inmovilización de la PGA succinilada sobre los distintos intercambiadores aniónicos, se realizaron estudios de desorción para cuantificar la fuerza de unión iónica entre la enzima y el soporte. Es importante destacar que no es posible

obtener este tipo de derivados con la enzima nativa. En la **Figura 6**, se observa cómo la concentración de NaCl necesaria para desorber las enzimas succiniladas del soporte agarosa-PEI es más alta que para el soporte agarosa DEAE. Así por ejemplo, cuando se utilizó una concentración de 300 mM de NaCl, se desorbió el 100% de la actividad del soporte comercial agarosa DEAE de la enzima PGA-suc-40, mientras que a esa misma concentración de NaCl, el 80% la PGA-suc-40 permaneció inmovilizada sobre agarosa-PEI.

También se puede apreciar cómo, dependiendo del grado de modificación que presente la enzima, existen diferencias en la fuerza de adsorción al intercambiador. Como muestra la **Figura 6**, un mayor número de grupos carboxilo confiere una mayor fuerza de adsorción al soporte, ya sea de tipo DEAE o PEI. Se desorbió un 50% de la actividad de PGA-suc-100 inmovilizada en agarosa PEI a una concentración de 600 mM de NaCl mientras que a dicha concentración la PGA-suc-40 estaba completamente desorbida del mismo soporte, lo cual indica que el aumento de cargas superficiales negativas aumenta la fuerza de adsorción a estos soportes.

Combinando ambos elementos -tipo de soporte y grado de modificación- es posible obtener derivados enzimáticos con fuerzas de unión significativamente diferentes. La enzima con todos los grupos amino succinilados, PGA-suc-100, no es capaz de ser completamente desorbida del soporte agarosa-PEI hasta una concentración superior a 1 M de NaCl mientras que la PGA parcialmente modificada, PGA-suc-40, es completamente desorbida del soporte con tan sólo 300 M de NaCl.

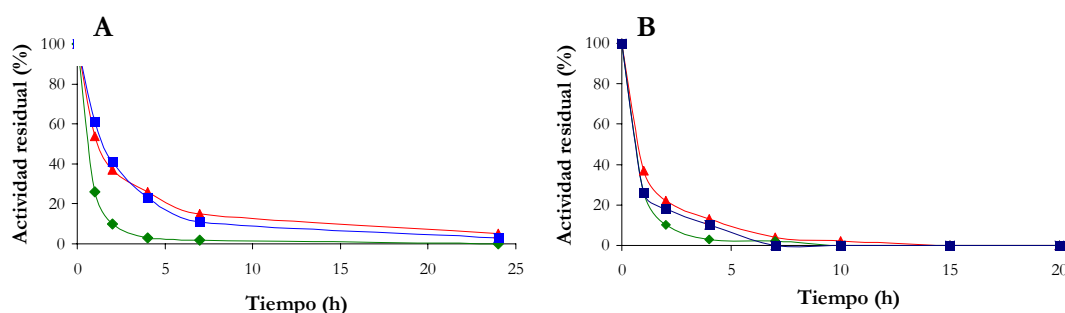


**Figura 6.** Desorción de las distintas PGAs succiniladas adsorbidas sobre intercambiadores aniónicos (DEAE y PEI) mediante el uso de concentraciones crecientes de NaCl. Actividad desorbida de DEAE-agarosa: (▲) PGA-suc-100 y (■) PGA-suc-40. Actividad desorbida de agarosa PEI 25kD (△) PGA-suc-100; (□) PGA-suc-40. Las enzimas se inmovilizaron en tampón fosfato 25mM, pH 7.0. Actividad inicial: 20 UI/ml de soporte.

### 1.3.3 Estabilidad térmica de las preparaciones inmovilizadas de PGA succinilada.

La gran fuerza de adsorción iónica que se encontró entre la enzima y el soporte agarosa-PEI podría conferir también un mayor grado de estabilización de la estructura tridimensional de la enzima frente a distintos agentes desnaturalizantes entre ellos la temperatura, por lo que se llevaron a cabo estudios de estabilidad térmica.

En la **Figura 7** se muestran los cursos de inactivación térmica de diferentes derivados de la PGA succinilada adsorbida sobre los intercambiadores aniónicos y de la enzima covalentemente unida de forma unipuntual a agarosa-BrCN por el amino terminal. Los derivados de PGA-suc-40 (**Fig. 7A**) fueron más estables que los derivados de PGA-suc-100 (**Fig. 7B**), mientras que no se observaron diferencias significativas en la estabilidad térmica entre los distintos derivados de cada enzima succinilada.



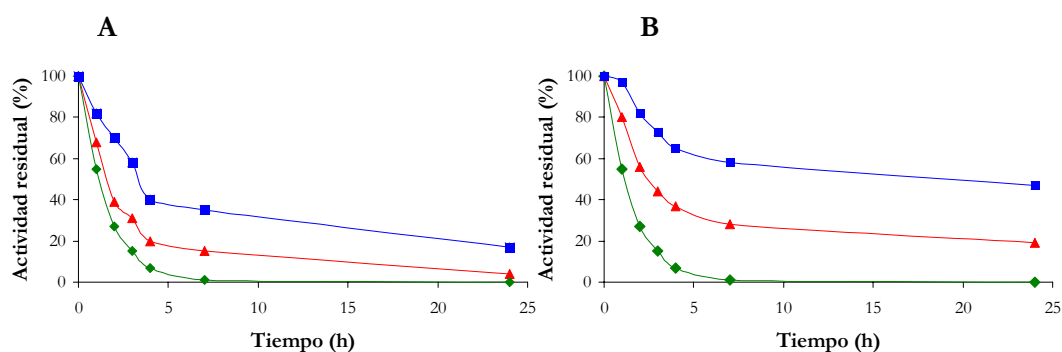
**Figura 7.** Cursos de inactivación térmica de diferentes derivados de PGA succinilada. (A) PGA-suc-40 inmovilizada sobre: (♦) BrCN; (▲) Agarosa DEAE (■) Agarosa-PEI. (B) PGA-suc-100 inmovilizada sobre: (♦) BrCN; (▲) Agarosa DEAE (■) Agarosa-PEI. La inactivación se realizó en tampón fosfato 25mM, pH 7.0 a 57°C. Actividad inicial de 15 UI/ml.

### 1.3.4 Estabilidad de las preparaciones inmovilizadas de PGA succinilada en presencia de codisolvente.

Dado el interés que presenta la utilización de la PGA en reacciones que se llevan a cabo en presencia de codisolventes orgánicos, se realizó el estudio de su estabilidad frente a los mismos.

La **Figura 8** muestra que tanto las enzimas PGA-suc-40 como PGA-suc-100 adsorbidas sobre PEI fueron más estables que las unidas covalentemente a través del amino terminal o adsorbidas sobre DEAE agarosa en presencia de un 65% dioxano (v/v).

Como se ha visto en *Resultados 1.3.2*, el grado de modificación de los grupos amino de la superficie enzimática afectaba a la fuerza de unión enzima-soporte. En el caso de la estabilidad frente a disolventes ocurre una situación similar a la anterior; la enzima que presenta un mayor grado de modificación, PGA-suc-100, muestra una estabilidad mayor en presencia de disolventes que la modificada parcialmente, PGA-suc-40. Como se observa en la **Figura 8.B**, la PGA-suc-100 inmovilizada sobre PEI-agarosa presenta una vida media de 20 h mientras que la PGA-suc-40 inmovilizada sobre PEI ha perdido un 50% de actividad transcurridas 3.5 h (**Figura 8A**). Se logra estabilizar un factor de estabilización de 13 si se compara la estabilidad de la PGA-100 adsorbida sobre PEI respecto a la enzima unida unipuntualmente al soporte agarosa BrCN.



**Figura 8.** Estabilidad en 65% de dioxano (v/v) de diferentes derivados de PGA succinilada. (A) PGA-succ-40 inmovilizada sobre: (◆) Agarosa BrCN; (▲) Agarosa DEAE (■) Agarosa-PEI. (B) PGA-succ-100 inmovilizada sobre: (◆) Agarosa BrCN; (▲) Agarosa DEAE (■) Agarosa-PEI. Actividad inicial de 25UI/ml. Condiciones: 25 mM de fosfato de sodio pH 7.0 y 4°C.

#### 1.4 Inmovilización irreversible de la PGA succinilada sobre agarosa-PEI: entrecruzamiento con glutaraldehído.

Tras haber logrado la adsorción de la PGA succinilada sobre soportes de tipo PEI, se propuso el diseño de un nuevo tipo de derivado en el que se combinara tanto la adsorción de la proteína al soporte junto con una unión covalente para observar el efecto en la estabilidad de la proteína.

Una vez adsorbida la enzima succinilada sobre los soportes agarosa PEI se incubaron los derivados en presencia de una solución de glutaraldehído 0.5% (reactivo bifuncional que permite entrecruzar los grupos amino de la PEI y los grupos amino primarios de la enzima).

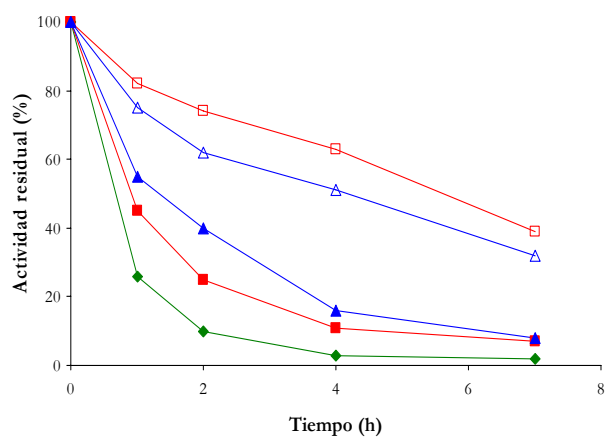
Para lograr un mayor entrecruzamiento, se decidió modificar la enzima con una cantidad de anhídrido succínico inferior a las utilizadas anteriormente. Se obtiene así una enzima que presenta un mayor número grupos aminos primarios sin modificar capaces de reaccionar con el glutaraldehído. La reacción de succinilación con un exceso 0.5 M de anhídrido succínico da lugar a una modificación del 20% de las lisinas expuestas (PGA-suc-20), permitiendo que un total de 29 lisinas puedan reaccionar con los grupos aldehído del glutaraldehído.

#### **1.4.1 Estabilidad térmica y en disolventes de los derivados de PGA succinilada entrecruzados con glutaraldehído.**

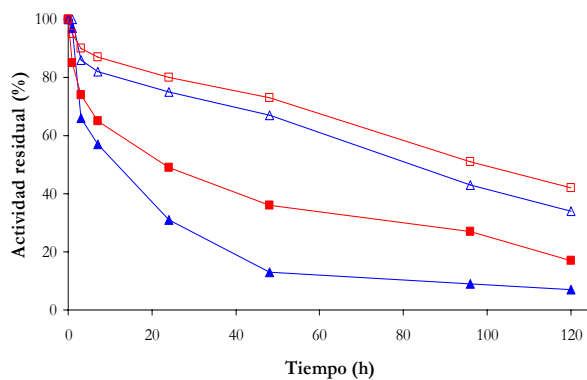
La **Figura 9A** muestra los cursos de inactivación térmica de los distintos derivados de PGA succinilada adsorbida sobre el soporte agarosa-PEI y posteriormente entrecruzada con glutaraldehído. Se observa como se logra un factor de estabilización de 4 veces con respecto a la enzima únicamente adsorbida sobre la PEI sin haber añadido el glutaraldehído en el caso de la PGA-suc-40 y un factor de 7 veces en el caso de la enzima con un número menor de grupos carboxilo introducidos (PGA-suc-20).

Al igual que en el caso de la inactivación térmica, también hay un aumento de estabilidad frente a codisolventes tras la modificación con glutaraldehído. Como muestra la **Figura 9B**, en 65% de dioxano el derivado de PGA-suc-20 entrecruzado con glutaraldehído presenta una vida media de 96 h, mientras que la vida media del derivado tan sólo adsorbido sobre agarosa PEI es de 24 h.

A



B



**Figura 9.** Estabilidad térmica (A) y en disolventes (B) de distintos derivados de PGA succinilada adsorbida sobre agarosa PEI y entrecruzada con glutaraldehído 0.5%. Enzima adsorbida sobre agarosa PEI (▲) PGA-suc-40; (■) PGA-suc-20. Enzima adsorbida y entrecruzada con glutaraldehído 0.5%(△) PGA-suc-40; (□) PGA-suc-20; (◆) PGA soluble. (A) Inactivación llevada a cabo a 55°C en tampón fosfato 25mM pH 7.0. Todas las muestras parten de una actividad inicial de 15UI/ml. (B) Inactivación llevada a cabo en tampón fosfato 25mM pH 7.0 a 4°C. Actividad inicial de 15UI/ml.



## **2. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE LA PENICILINA G ACILASA DE *E. coli* CON ETILENDIAMINA (EDA).**

### **2.1 Análisis de los residuos susceptibles de modificación.**

Una segunda modificación química que se realizó fue la introducción de grupos aminos primarios en la superficie proteica mediante la reacción de los grupos ácidos de la PGA con etilendiamina (EDA).

Como se ha mostrado en la **Figura 2**, la PGA presenta un total de 99 grupos carboxilos, 77 de los cuales son accesibles al medio de reacción y por lo tanto, capaces de sufrir esta modificación. Los grupos carboxilo reaccionan con etilendiamina previa activación de los mismos con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), según el método desarrollado por Hoare y Koshland Jr. (1967).

### **2.2 Caracterización de la PGA aminada.**

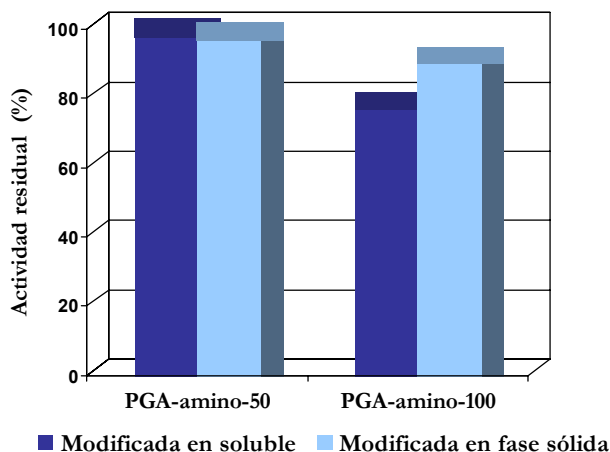
#### **2.2.1 Control del grado de aminación química.**

Se ha descrito que es posible controlar el grado de aminación de la PGA variando la concentración de EDAC utilizada (Fernández-Lafuente *et al.*, 1992). De esta forma, se realizó la modificación de la PGA con concentraciones de EDAC de 10mM, para alcanzar un grado de modificación del 50% y 100 mM, para lograr un 100% de los grupos carboxilo modificados. Se denominarán PGA-amino-50 y PGA-amino-100, respectivamente.

Así se ha logrado incrementar de 36 a 74 aminos primarios superficiales (lys y glu/asp aminados) en el caso de la PGA-amino-50. En el caso de la PGA-amino-100 el número de cargas positivas introducidas es mayor, aumentando de 36 a 113 (lys y glu/asp aminados).

#### **2.2.2 Efecto de la aminación en la actividad catalítica.**

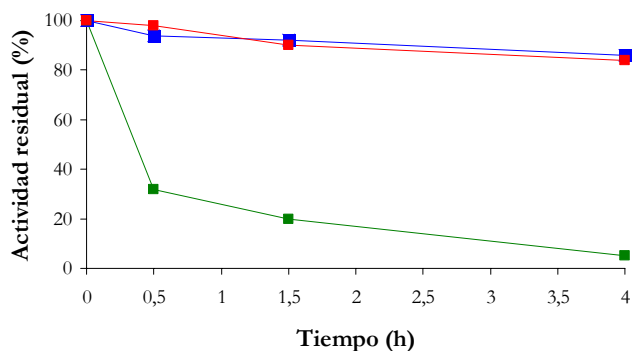
Se llevó a cabo un estudio para comprobar el efecto que la aminación puede provocar sobre la actividad de la enzima. Como se muestra en la **Figura 10**, la modificación total de los grupos carboxilos, PGA-amino-100, conduce a una pérdida aproximada de un 20% de la actividad inicial, mientras que una modificación del 50% de los grupos carboxilo, PGA-amino-50, no disminuye la actividad.

**Figura 10.**

Efecto de la aminación de la PGA en la actividad catalítica en la enzima soluble y en la inmovilizada sobre agarosa-BrCN. PGA-amino-50: modificada con 10mM CDI. PGA-amino-100: modificada con 100mM CDI. La actividad inicial: 20UI/ml (1.7mg/ml) para las enzimas solubles y 15UI/g de soporte para las enzimas inmovilizadas.

### 2.2.3 Estabilidad térmica de la enzima aminada soluble.

La **Figura 11** muestra que la PGA-amino-50 presenta una estabilidad térmica similar a la de la PGA sin modificar, decayendo su actividad sólo un 10% después de 4 h de incubación a 50°C. Sin embargo, la modificación del 100% de los grupos carboxilo de la enzima, disminuye notoriamente la estabilidad térmica de la misma, observándose una disminución del 80% de la actividad en menos de 2 h de incubación a dicha temperatura.

**Figura 11.**

Curso de inactivación térmica de PGA con distintos grados de aminación.

Enzimas solubles: (■) PGA nativa; (■) PGA-amino-100; (■) PGA-amino-50. La inactivación se realizó a 50°C en tampón fosfato 25mM, pH 7.0. Actividad inicial de 10UI/ml.

Tras el estudio de caracterización de la enzima aminada en solución, se decidió inmovilizar las enzimas modificadas sobre distintos tipos de soportes, planteándose dos estrategias de inmovilización. La primera de ellas fue la inmovilización covalente de la enzima aminada sobre soportes agarosa con grupos glioxil capaces de reaccionar con aminos primarios (Mateo *et al.*, 2006a). La segunda, su adsorción a intercambiadores catiónicos tipo agarosa carboximetil (CM) y agarosa dextrano sulfato (DS).

## 2.3 Inmovilización de la PGA aminada sobre soportes agarosa glioxil. Unión covalente multipuntual.

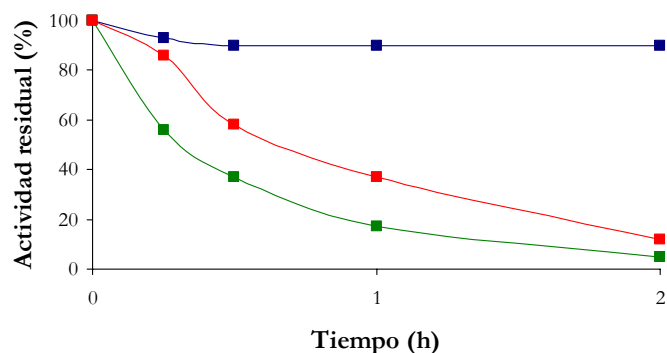
### 2.3.1 Efecto del pH en la cinética de inmovilización.

La inmovilización covalente multipuntual sobre soportes agarosa glioxil a pH 10.0 se llevó a cabo según el protocolo desarrollado por Guisán (1988), donde la enzima se inmoviliza sobre el soporte por las zonas más ricas en lisinas de su superficie; a pH 10.0 las lisinas estarán desprotonadas permitiendo el ataque nucleófilo de los grupos amino sobre los aldehídos del soporte. Este protocolo condujo a rendimientos de inmovilización del 100% de la enzima ofrecida, tanto nativa como aminada, en menos de 15 minutos con una actividad recuperada del 100% de la inicialmente ofrecida. No se encontraron diferencias en la velocidad de inmovilización entre la enzima sin modificar y las aminadas.

En un segundo caso, se modificó el protocolo estándar, realizando la inmovilización a pH 9.0 en lugar de a pH 10.0 (**Figura 12**). Se observa que la enzima nativa no se inmoviliza sobre el soporte agarosa glioxil a dicho pH mientras que las enzimas aminadas sí. El 80% de la actividad inicial de la enzima PGA-amino-100 ofrecida al soporte se inmoviliza en la primera hora mientras que la enzima sin modificar no es capaz de unirse al soporte.

Esto podría explicarse si pensamos que a pH 9.0 los grupos amino de las lisinas de la proteína no se encuentran como nucleófilos así que son incapaces de reaccionar con los aldehídos del soporte. En el caso de la enzima modificada químicamente, los grupos introducidos presentan un  $pK_a$  de 9.2 por lo tanto, a pH 9.0 sí serían reactivos pudiendo establecer una unión covalente multipuntual con el soporte.

Posteriormente, estos derivados inmovilizados a pH 9.0 se incubaron a pH 10.0 durante tres horas más para permitir que los grupos amino de las lisinas, ahora ya como nucleófilos, reaccionen con el soporte y así aumentar el número de enlaces covalentes.

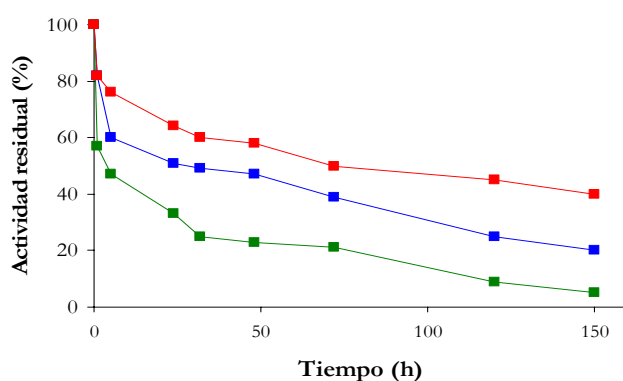


**Figura 12.** Cinética de inmovilización de la PGA sobre agarosa glioxil a pH 9.0. Enzimas solubles: (■) PGA nativa; (■) PGA-amino-100; (■) PGA-amino-50. La inactivación se realizó a 50°C en tampón fosfato 25 mM, pH 7.0. Actividad inicial de 10 UI/ml.

### 2.3.2 Estabilidad frente a temperatura, pH y disolventes orgánicos.

Una vez inmovilizadas las enzimas sobre el soporte agarosa glioxil bajo las condiciones estándar a pH 10, los derivados se sometieron a diferentes condiciones para evaluar su estabilidad.

En primer lugar, se estudió la estabilidad térmica de los derivados glioxil-enzima aminada a una temperatura de 66°C y pH 7.0 (**Figura 13**). Se observa cómo la vida media de los derivados es de 100 h de incubación en el caso de la PGA parcialmente aminada (PGA-amino-50), 20 h en el caso de la PGA nativa y 10 h en la PGA totalmente aminada (PGA-amino-100).



**Figura 13.**

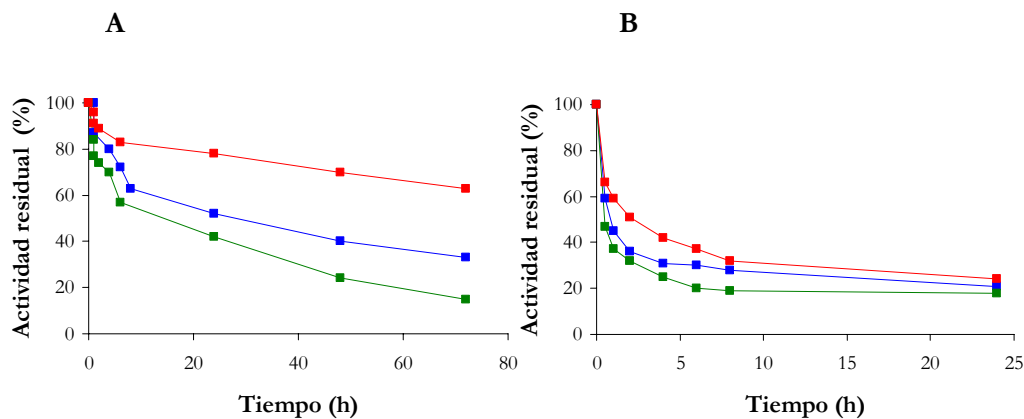
Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los derivados glioxil-PGA aaminadas.

(■) PGA nativa; (■) PGA-amino-100; (■) PGA-amino-50.

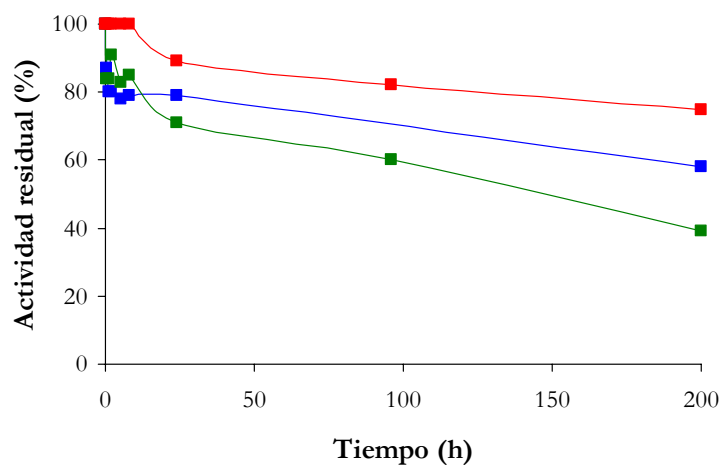
Inactivación realizada a 66°C en tampón fosfato 25mM pH 7.0. Inmovilización llevada a cabo a pH 10. Actividad inicial de 12 UI/ml.

También se evaluó la estabilidad de los derivados a distintos valores de pH (**Figuras 14**). El estudio refleja que todos los derivados en general son más estables a pH ácido que a pH básico donde presentan cinéticas de inactivación similares (**Figura 14B**). A pH 5.0 (**Figura 14A**) podemos observar que transcurridas 25 horas el derivado glioxil PGA-amino-50 mantiene el 90% de actividad mientras que los derivados de la PGA nativa y totalmente aminada (PGA-amino-100) han perdido más del 50% de su actividad.

Cuando se estudió la estabilidad de los derivados en 60% dimetilformamida (v/v) (**Figura 15**), se observan curvas de inactivación similares a las anteriores donde el derivado más estable es el parcialmente aaminado (PGA-amino-50). Éste mantiene el 80% de su actividad transcurridas 200 h de incubación mientras la PGA nativa mantiene un 60% de actividad y la totalmente aaminada tan sólo un 40% en ese mismo tiempo.



**Figura 14.** Efecto del pH sobre la estabilidad térmica de los derivados glioxil-PGA aminadas. Condiciones: A. Inactivación a pH 5.0 en tampón acetato de sodio 25 mM. B. Inactivación a pH 8 en tampón fosfato 25 mM. (■) PGA nativa; (■) PGA-amino-100; (■) PGA-amino-50. Temperatura inactivación: 66°C. Actividad inicial de 12 UI/ml.



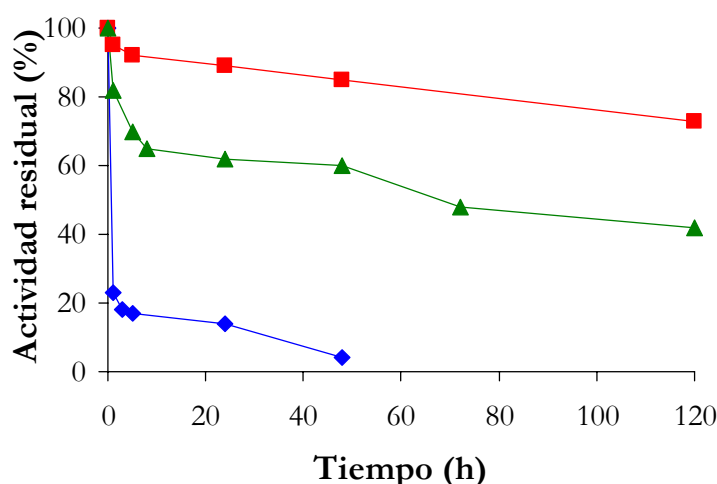
**Figura 15.** Estabilidad en 60% de dimetilformamida (DMF) (v/v) de los derivados agarosa glioxil-PGA aminadas. (■) PGA nativa; (■) PGA-amino-100; (■) PGA-amino-50. Temperatura inactivación: 66°C. Condiciones: 4°C en tampón acetato 25mM pH 6.5. Actividad inicial de 14UI/ml.

A la vista de estos resultados se podría decir que, en las condiciones estudiadas, los derivados preparados con la PGA que tiene el 50% de los grupos aminados (PGA-amino-50) son más estables que los preparados con la PGA nativa o con la enzima totalmente aminada (PGA-amino-100).

### 2.3.3 Efecto del pH de inmovilización en la estabilidad térmica de los derivados.

También se estudió el efecto del pH al que se realiza la inmovilización sobre el soporte en la estabilidad de los derivados. En la **Figura 16** se muestran las cinéticas de inactivación térmica de los derivados de PGA-amino-50 inmovilizados a pH 9.0, los derivados inmovilizados a pH 10.0 (control) y los derivados en los que la enzima se inmoviliza a pH 9.0 y posteriormente se incuba durante 3 h a pH 10.0.

Como se ha observado anteriormente (**Figura 12**), la enzima nativa a pH 9.0 no es capaz de unirse al soporte glioxil (Alvaro *et al.*, 1990) mientras que la modificada químicamente con EDA sí reacciona con los aldehídos del soporte a dicho pH. En la **Figura 16** se observa que una inmovilización a pH 9.0 y una posterior incubación a pH 10.0 de la enzima aminada mejora la estabilidad térmica de los derivados. El derivado preparado con la PGA-amino-50 inmovilizada a pH 9.0 e incubado posteriormente a pH 10.0 es alrededor de 150 veces más estable que dicho derivado inmovilizado a pH 9.0, y 3 veces más estable el inmovilizado a pH 10.0.



**Figura 16.** Curso de inactivación térmica de los derivados de glioxil-PGA-amino-50 inmovilizados a distintos valores de pH.

(◆) PGA-amino-50 inmovilizada a pH 9 sobre agarosa glioxil; (▲) PGA-amino-50 inmovilizada a pH 10 sobre agarosa glioxil; (■) PGA-amino-50 inmovilizada a pH 9 sobre glioxil agarosa e incubada a pH 10 durante 24 h. Inactivación en tampón fosfato de sodio 25mM pH 7.0, 66°C. Actividad inicial de 12UI/ml.

## 2.4 Inmovilización por adsorción iónica sobre intercambiadores catiónicos.

La introducción de grupos amino químicamente en la PGA también nos permite estudiar su efecto en la inmovilización por adsorción a intercambiadores catiónicos convencionales [agarosa-carboximetil, (ACM)] y de tipo polimérico [agarosa-dextrano sulfato (ADS)] (Fuentes *et al.*, 2004a), donde la agarosa está recubierta del polímero comercial dextrano sulfato.

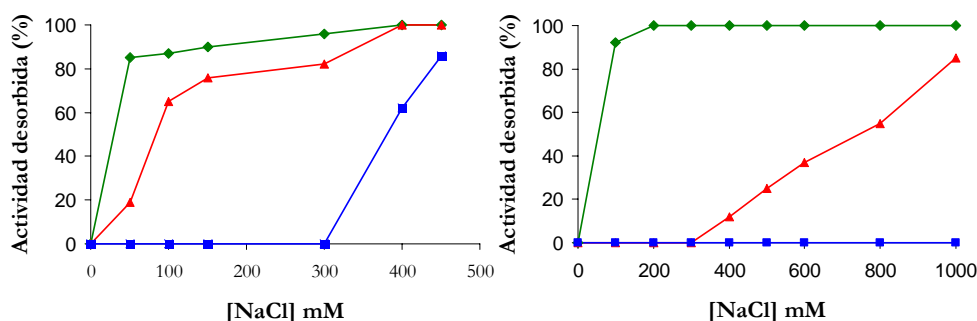
### 2.4.1 Cinética de inmovilización sobre ACM y ADS.

Se estudió la cinética de inmovilización de las enzimas modificadas sobre ambos soportes iónicos. En la **Tabla 2** se observa cómo las enzimas aminadas, ya sea total o parcialmente, alcanzan altos rendimientos de inmovilización. Apenas transcurridas 1.5 h, se observa que el 100% de la actividad ofrecida inicialmente se ha adsorbido a la matriz tanto en el caso de la PGA-amino-50 como en el de PGA-amino-100 mientras que la PGA sin modificar tan sólo se ha inmovilizado un 10-15% de la actividad ofrecida inicialmente.

Enzima	Rendimiento de inmovilización (%)		Actividad expresada (%)	
	ACM	ADS	ACM	ADS
PGA no modificada	14	10	90	95
PGA-amino-50	100	100	97	100
PGA-amino-100	100	100	94	99

**Tabla 2.** Inmovilización de PGA aminada sobre carboximetilagarosa (ACM) y dextransulfato agarosa (ADS). Condiciones de inmovilización: 5mM de fosfato de sodio pH 7.0 25°C.

Las velocidades de inmovilización fueron similares en ambas enzimas y en los dos tipos de soporte. Por otro lado, también apreciamos que las moléculas de enzima una vez inmovilizadas no pierden su actividad (actividad expresada).



**Figura 17.** Estudio de la fuerza de unión de la PGA nativa y aminadas adsorbidas sobre intercambiadores catiónicos (ACM y ADS). A. Actividad desorbida de carboximetil agarosa (ACM) B. Actividad desorbida de agarosa dextrán sulfato (ADS). (▲) PGA-amino-50 y (■) PGA-amino-100 (◆) PGA nativa. Las enzimas se inmovilizaron en tampón fosfato 25mM, pH 7.0. Condiciones de desorción: tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 con concentraciones crecientes de NaCl. Actividad enzimática inicial de 15 UI/ml soporte.

#### 2.4.2 Estudio de la fuerza de unión de las enzimas al soporte iónico.

Para determinar la fuerza de unión entre la enzima nativa o modificada y los soportes aniónicos se realizaron estudios de desorción de la proteína aumentando la fuerza iónica del medio (agregando cantidades crecientes de NaCl).

La **Figura 17** muestra la desorción tanto de la PGA nativa como de las PGAs aminadas. La pequeña fracción de PGA no modificada adsorbida en los intercambiadores catiónicos pudo ser fácilmente desorbida de ambos soportes, ACM (**Figura 17A**) y de ADS (**Figura 17B**). Para lograr la desorción completa de la PGA-amino-50 de ACM se necesita una fuerza iónica de 400 mM de NaCl. Esta misma enzima adsorbida sobre el otro intercambiador (ADS) a dicha concentración, sólo un 10% de la enzima se libera del soporte, no logrando su desorción completa hasta concentraciones de 1 M de NaCl.

Al igual que sucedía con la enzima succinilada, un mayor grado de aminación química supone una adsorción más fuerte en ambos tipos de soporte. A modo de ejemplo, vemos como la PGA-amino-100 permanece totalmente adsorbida a ADS en presencia de 1 M NaCl, mientras que la enzima con un grado de aminación menor (PGA-amino-50) está prácticamente desorbida a dicha concentración.



Además del tipo de soporte utilizado en la inmovilización también hay que tener en cuenta el grado de modificación presente en la enzima. Combinando ambos factores es posible obtener derivados con propiedades interesantes a la hora de ser utilizados como catalizadores industriales.

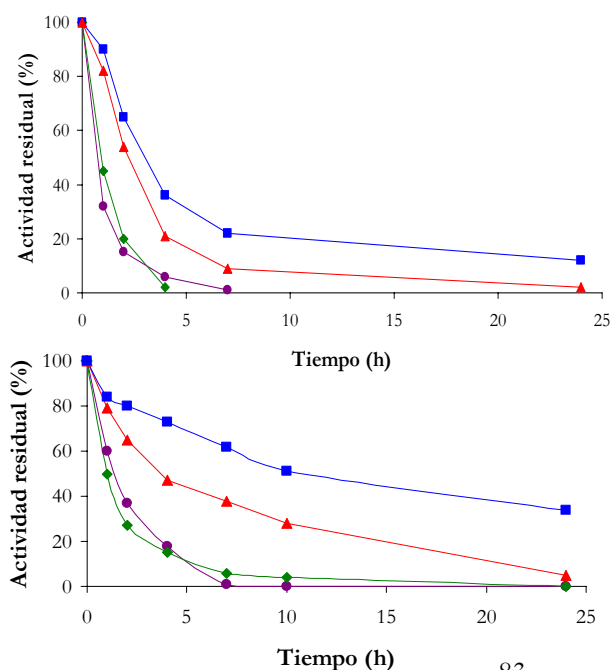
#### 2.4.3 Estabilidad térmica de las diferentes preparaciones de PGA aminada.

Tras considerar el efecto negativo que tiene la modificación química sobre la estabilidad térmica de la enzima con los grupos carboxilo totalmente aminados (PGA-amino-100) (**Figura 11**), se decidió continuar los estudios de estabilidad utilizando sólo la enzima modificada parcialmente (PGA-amino-50).

Tras adsorber la PGA-amino-50 sobre los intercambiadores catiónicos se estudió su estabilidad térmica. La **Figura 18A** muestra cómo las cinéticas de inactivación térmica de los distintos derivados de PGA-amino-50 y el derivado comercial de Fluka son similares, no lográndose un factor de estabilización significativo.

#### 2.4.4 Estabilidad frente a codisolvente de las preparaciones de PGA aminada.

Al estudiar la estabilidad de estos mismos derivados en presencia de codisolventes orgánicos, la enzima inmovilizada a través de su amino terminal (BrCN-PGA-amino-50) presenta una estabilidad similar al derivado comercial de Fluka (**Figura 18B**). Sin embargo, la enzima adsorbida sobre ADS presenta una estabilidad mayor en presencia de dioxano comparada con los anteriores (15 veces más estable que el derivado de BrCN).

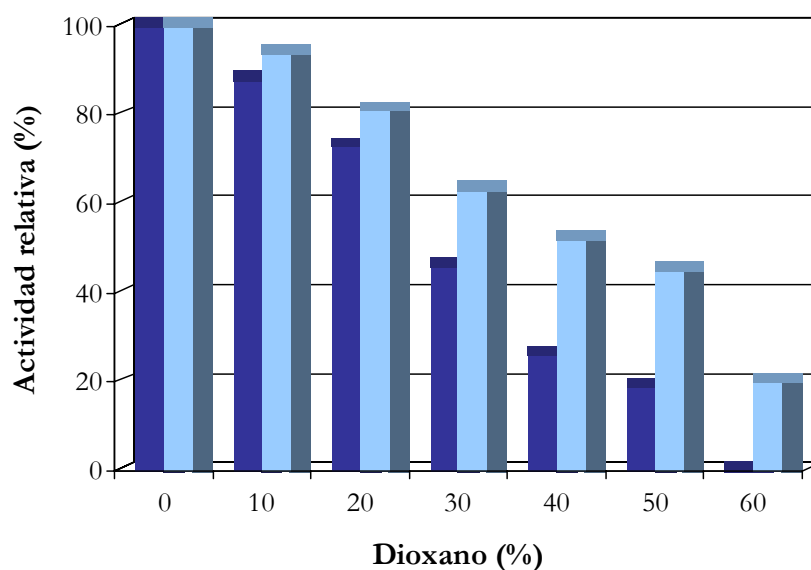


**Figura 18.**

Cursos de estabilidad térmica (A) y estabilidad frente a disolvente (B) de los derivados de PGA-amino-50. (◆)BrCN; (▲)ACM; (■)ADS; (●)Derivado comercial de Fluka-PGA. A. Inactivación térmica se realizó en tampón fosfato 25mM, pH 7.0 a 57°C. B. Estabilidad en dioxano 60% (v/v) llevada a cabo en tampón fosfato 25mM pH 7.0 a 4°C. Actividad inicial de 15 UI/ml.

#### 2.4.5 Estudio de la inhibición por dioxano de derivados de PGA aminada.

Debido a los resultados previamente obtenidos de estabilización frente al dioxano, se estudió el efecto de inhibición de dicho disolvente en la actividad de la enzima en la hidrólisis de (R)-mandelato de metilo (**Figura 19**). Para ello, se comparó la actividad de la enzima nativa PGA inmovilizada en BrCN con el mejor derivado que se había obtenido con la enzima aminada (PGA-amino-50 inmovilizada sobre ADS). Este derivado con la enzima adsorbida sufre una inhibición menor que la enzima unida covalentemente. Las diferencias entre ambos son más acusadas cuanto mayor es el porcentaje de dioxano empleado. Cuando tenemos un 60% de dioxano en la reacción, la enzima unida por el amino terminal está totalmente inhibida mientras que el derivado inmovilizado sobre dextrano sulfato mantiene el 20% de actividad inicial expresada en medio totalmente acuoso.



**Figura 19.** Efecto del dioxano en la actividad de los diferentes derivados de PGA. (■) PGA nativa inmovilizada sobre agarosa BrCN; (■) PGA-amino-50 inmovilizada sobre agarosa DS. Se midió la actividad en hidrólisis de (R)-(-) mandelato de metilo 10 mM en 50mM de fosfato de sodio, añadiendo el correspondiente porcentaje de dioxano y ajustando el pH a un valor de 7.0. El 100% fue considerado como la actividad de la en medio acuoso.

### **3. AUMENTO DEL NÚMERO DE GRUPOS CARBOXILO EN LA SUPERFICIE DE LA PENICILINA G ACILASA DE *E. coli* POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**

#### **3.1 Obtención del mutante enriquecido en 8 glutámicos (PGA8glu).**

##### **3.1.1 Diseño y selección de residuos a mutar.**

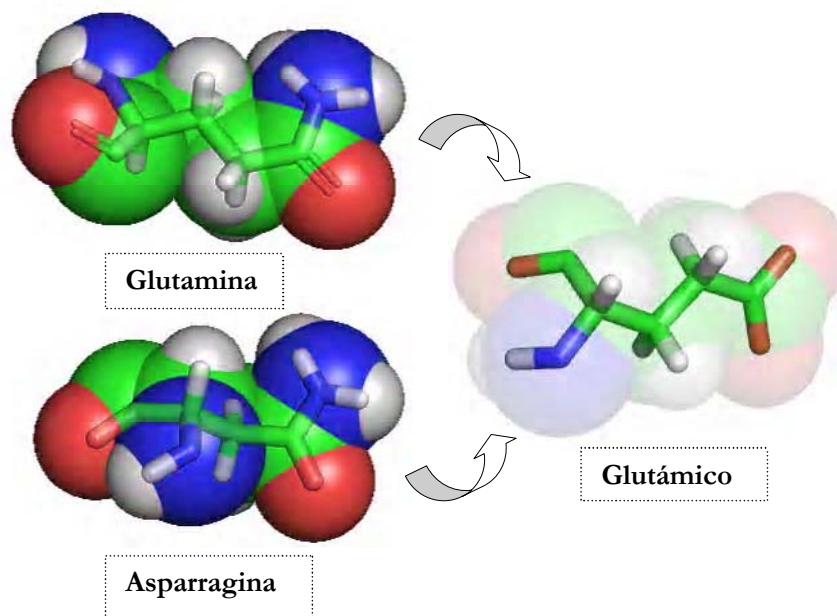
Como se ha visto en *Resultados 1.3*, se han obtenido buenos resultados tras lograr inmovilizar la enzima succinilada sobre soportes de tipo agarosa PEI mientras que la enzima nativa no era capaz de adsorberse a dicho soporte. Por ello, se planteó entonces una nueva estrategia para mejorar los procesos de inmovilización-estabilización de la PGA mediante mutagénesis dirigida sobre residuos de la superficie de la proteína

De manera análoga a la succinilación, se pretende ahora aumentar el número de cargas negativas en la superficie de la PGA con el fin de lograr la inmovilización de la enzima mutada sobre intercambiadores aniónicos.

En primer lugar se realizó un estudio de la superficie de la proteína para el diseño del mutante. A la hora de seleccionar qué residuos mutar de la superficie se siguieron las siguientes premisas:

1. Distribuir las mutaciones por toda la superficie de la proteína. Se dividió la proteína en 8 octantes en los que se pretende introducir una mutación por octante. Con estas mutaciones lo que se quiere conseguir es un cambio en la carga superficial para lograr la adsorción de la PGA al intercambiador polimérico (agarosa PEI).
2. Realizar mutaciones conservadoras que en principio no afecten a la estructura tridimensional de la enzima.
3. Seleccionar residuos que estuviesen lo más expuestos al medio para poder lograr una mejor interacción con el soporte.

Tras realizar un estudio de la superficie proteica y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se decidió mutar residuos de asparragina y glutamina a glutámicos por ser aminoácidos con estructura y tamaño similar cuya diferencia radica en la introducción del grupo carboxilo (**Figura 20**). El aumento en el número de glutámicos permitiría el incremento de la carga global negativa.

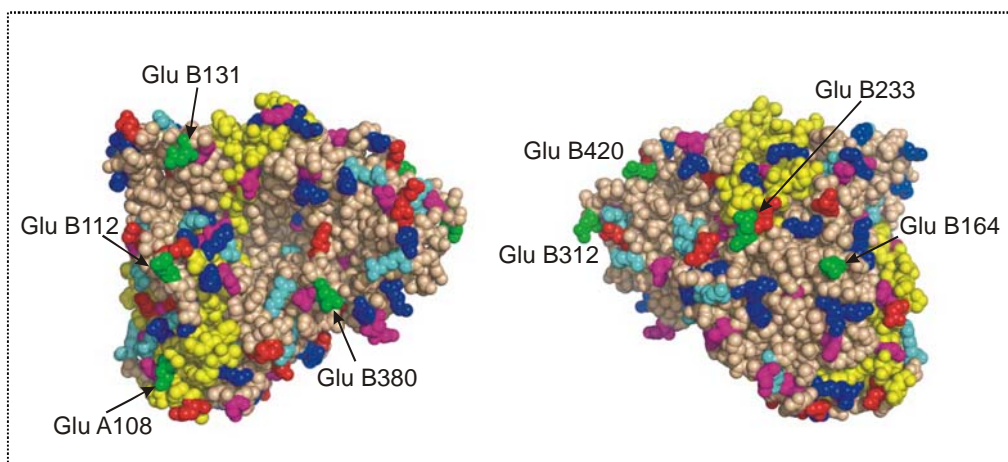


**Figura 20.** Estructura de los aminoácidos mutados en el mutante PGA8glu. Glutaminas y asparaginas son mutadas a glutámicos. Como se observa en la figura, se pretende conservar la estructura y tamaño del aminoácido introduciendo una única carga negativa adicional en el radical del aminoácido. Código de colores azul N, rojo O, blanco H. Obtenido con Pymol versión 0.99.

### 3.1.2 Análisis del efecto de las mutaciones en la estructura tridimensional de la PGA.

Tras haber seleccionado los residuos a mutar, como paso previo a obtener el mutante real, se realizó un estudio de simulación mediante dinámica molecular con el programa X-PLOR (Brünger *et al.*, 1990), para ver si las mutaciones elegidas afectarían al plegamiento y a la conformación tridimensional de la enzima. Después de mutar virtualmente los ocho residuos (**Figura 21**) utilizando el programa O (Jones *et al.*, 1991), se aplicó a cada mutante el protocolo de dinámica molecular validado con la enzima ferredoxin reductasa de *Anabaena* PCC7119 (FNR) (Abián, 2003).

Una vez obtenida la estructura tridimensional del mutante, se comparó con la estructura de la enzima nativa obteniendo un grado de superposición muy bueno (**Figura 22**). Para confirmar este resultado se analizó cuantitativamente el grado de superposición calculando la diferencia en las desviaciones cuadráticas medias (r.m.s.d) entre la estructura del mutante y de la PGA nativa. Se obtuvo un valor de r.m.s.d. de 0.164 Å, correspondiente a la diferencia obtenida entre los carbonos  $\alpha$  de ambas estructuras.



**Figura 21.** Estructura tridimensional de la PGA mutada que presenta los nuevos 8 glutámicos. Los residuos mutados aparecen en naranja. Lisinas en azul oscuro, argininas en azul claro, glutámicos en rojo y aspárticos en rosa. La subunidad  $\alpha$  de la PGA aparece en amarillo. Realizado con Pymol versión 0.99.



**Figura 22.** Superposición de los modelos tridimensionales de la PGA nativa y la PGA8glu. La PGA nativa se representó de color verde y la PGA mutada en violeta. Representación realizada en Molscrip.

### 3.1.3 Producción, purificación y caracterización del mutante PGA8glu.

Tras haber realizado el análisis teórico, observando que probablemente la estructura del mutante permanecería inalterada, se procedió a la obtención del mutante mediante una estrategia de mutagénesis dirigida.

Las mutaciones se introdujeron como se ha descrito en *Material y Métodos* 9.5.2, mediante distintas rondas de PCR sobre el gen *pac* de la penicilina G acilasa de *E. coli* ATCC 11105 clonado en el vector de expresión pET101/D-TOPO (pOAF) (Abián, 2003). Tras secuenciar el nuevo plásmido (pPGA8glu) y comprobar la presencia de todas las mutaciones deseadas, se transformaron células hiperexpresoras BL21 de *E. coli* para obtener el mutante.

En la **Tabla 3** se muestra la purificación correspondiente al mutante PGA8glu y la PGA nativa, tras las distintas etapas desde la ruptura celular hasta su elución de la columna de Q-Sepharosa. El nivel de expresión es similar a la enzima nativa (250 UI/L de medio de cultivo) y se alcanzó un rendimiento de purificación del 80%. La actividad específica obtenida para la enzima nativa fue de 28 UI/mg similar a la obtenida para el mutante, 23 UI/mg.

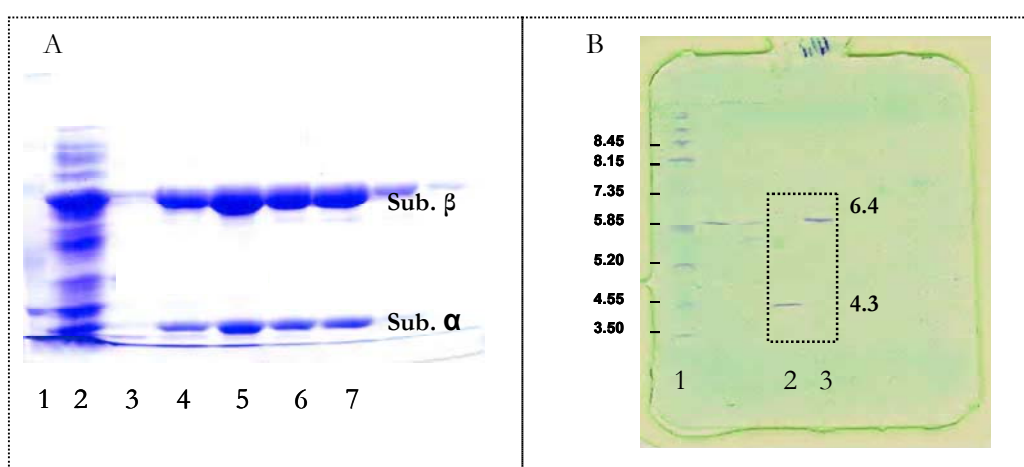
	Proteína total (mg) <sup>a</sup>	Actividad total (IU) <sup>b</sup>	Actividad específica (IU/mg)	Actividad recuperada (%)	Factor de Purificación
<b>PGA</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	170	720	4	100	
Purificada	16	448	28	62	7
<b>PGA 8 glu</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	157	615	4	100	
Purificada	21	490	23	80	6

**Tabla 3.** Purificación del mutante PGA8glu y PGA nativa.

<sup>a</sup> La concentración de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (1978) utilizando albúmina como estándar.<sup>b</sup> La actividad enzimática total se determinó mediante el ensayo con NIPAB como se describe en Métodos.<sup>c</sup> Extracto crudo es la fracción de sobrenadante después de sonicar las células BL21 de *E. coli*.

La **Figura 23A** muestra un análisis por SDS-PAGE de las muestras obtenidas en la purificación del mutante PGA8glu. Se obtuvieron fracciones puras tras la elución del mutante de la columna de Q-Sepharosa. Cabe destacar que la desorción de la enzima PGA8glu de la columna de Q-Sepharosa se realiza con un gradiente de 0-0.2 M de NaCl mientras que la nativa se puede desorber con un gradiente inferior (0-0.1 M NaCl).

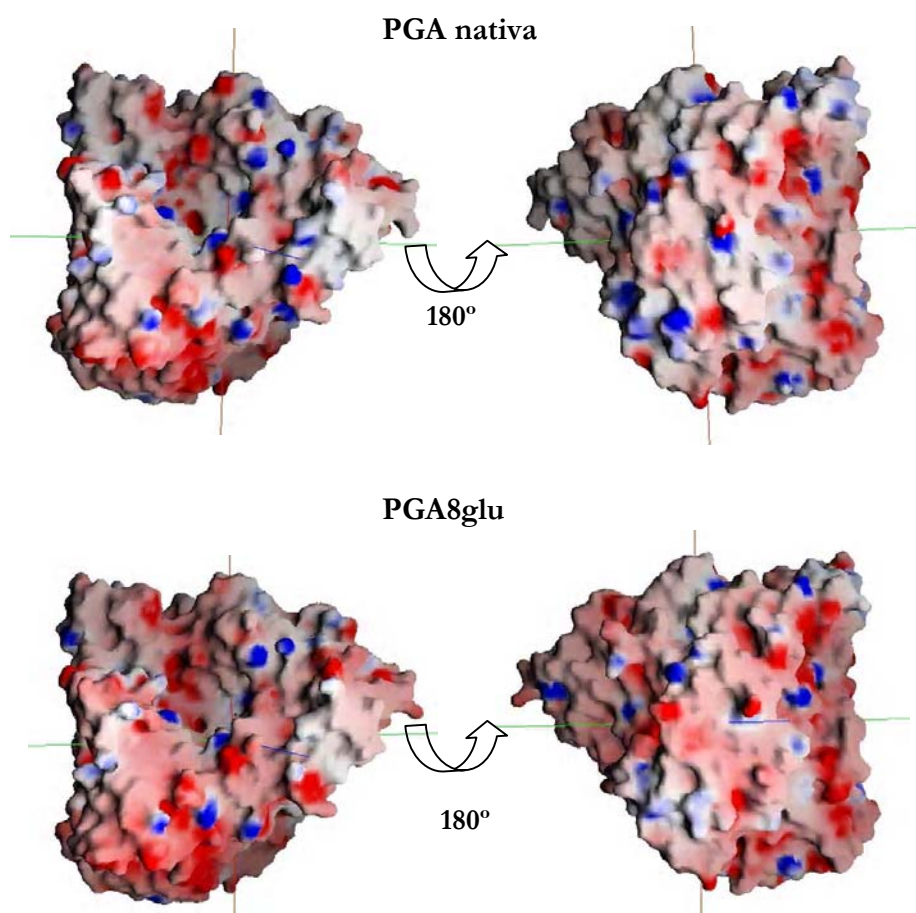
El siguiente paso fue realizar un isoelectroenfoque para comprobar si el punto isoelectrico (pI) de la enzima mutada había variado. Los 8 glutámicos introducidos en la superficie alteraron el pI de la enzima reduciendo el de la enzima nativa de 6.4 a 4.3 en el caso del mutante PGA8glu (**Figura 23B**). Junto con el cambio logrado en el punto isoelectrico se puede observar también un cambio en el potencial electrostático de superficie del mutante ya que se ha incrementado el número de cargas negativas expuestas (asp, glu y carboxilo terminal) a un total de 87 (**Figura 24**).



**Figura 23.** Purificación (A) y determinación del pI(B) del mutante PGA8glu.

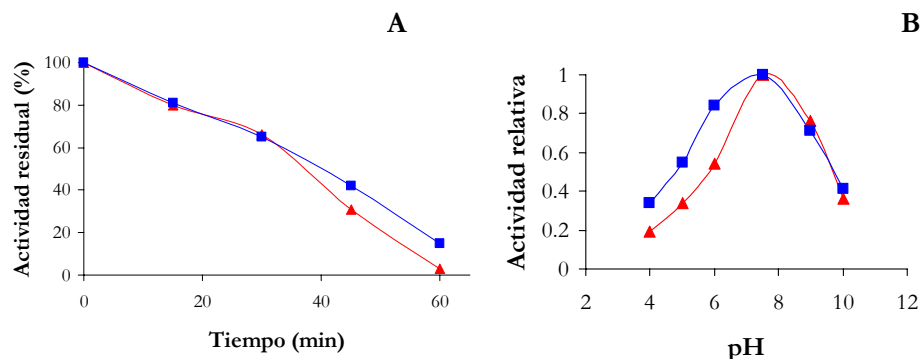
- A. SDS-PAGE de las distintas fracciones de PGA8glu tras su elución de la columna Q sepharosa con 0.2 M de NaCl. Carril 1: marcadores; carril 2: sobrenadante del extracto sonificado. Carril 4,5,6,7: fracciones recogidas por FPLC tras la desorción de Q sepharosa.
- B. El isoelectroenfoque se llevó a cabo mediante Pharmacia Phast System en un PhastGel® IEF pH 3-9. Carril 1: pI Calibration kit pH 3-9. Carril 2: PGA8glu. Carril 3: PGA nativa. El punto isoelectrico tanto del mutante como de la enzima nativa se estimó a partir de su posición relativa frente a los estándares de pI.

Se estudió el efecto de las mutaciones en la estabilidad térmica de la enzima soluble así como la actividad óptima a en un rango de pH de 4 a 10. Como muestra la **Figura 25A**, la enzima mutante presenta una estabilidad térmica a 55°C y pH 7.0 similar a la enzima nativa. Del mismo modo, el perfil de actividad-pH en ambas enzimas es similar (**Figura 25B**), mostrando su actividad óptima a pH 7.5. Tampoco se encontraron diferencias en el valor de  $K_m$  para el sustrato NIPAB entre ambas enzimas.



**Figura 24.** Representación en Grasp del cambio de potencial electrostático al aumentar el número de glutámicos en la superficie de la PGA de *E. coli*. A. PGA nativa. B. PGA8glu





**Figura 25.** A. Curso de inactivación térmica a 55°C en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0. B. Curva de actividad-pH utilizando. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C. Símbolos: (■) PGA8glu; (▲) PGA nativa. Actividad relativa: se expresa como actividad relativa con la actividad expresada a pH 7.5.

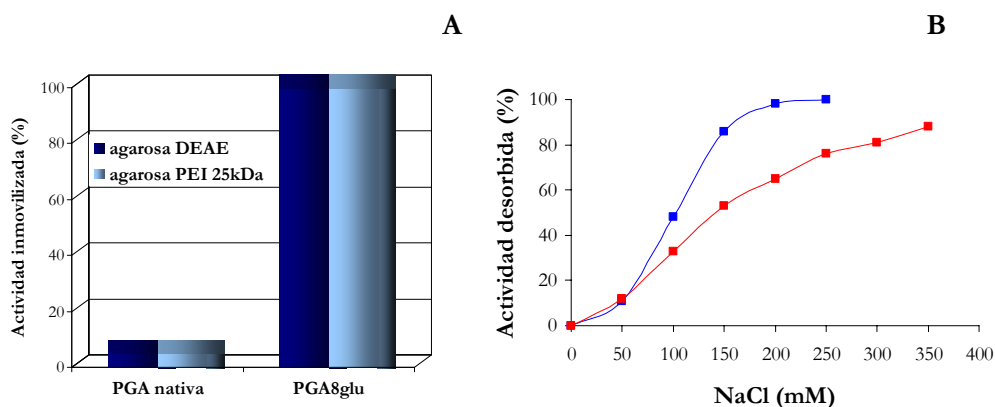
### 3.2 Inmovilización reversible sobre intercambiadores aniónicos.

El mutante PGA8glu presenta unas características similares a la enzima nativa, es decir, se ha logrado modificar la superficie de la enzima sin que los cambios afecten a su estructura tridimensional, estabilidad térmica o actividad. Tras obtener el mutante se realizaron distintos estudios sobre la adsorción de la enzima a intercambiadores aniónicos tipo agarosa DEAE y agarosa-PEI.

Ambos tipos de soporte comparten la presencia de grupos amino primarios capaces de interactuar con la enzima pero se diferencian en su estructura interna. Como se ha comentado en la *Introducción*, mientras que los grupos amino en la agarosa DEAE se encontrarían distribuidos sobre un mismo plano, la agarosa recubierta por el polímero-PEI presenta una distribución tridimensional de sus grupos amino.

#### 3.2.1 Estudio de la inmovilización sobre agarosa DEAE y agarosa PEI.

Tanto la enzima nativa como la enzima mutada PGA8glu se ofrecieron a agarosa DEAE y a agarosa-PEI de 25 kDa (**Figura 26A**). Como se puede apreciar, la enzima nativa no se adsorbió significativamente a ninguno de los soportes, mientras que la enzima mutada sí es capaz de adsorberse. En ambos casos, la actividad de la enzima permaneció inalterada tras la adsorción.



**Figura 26.** Inmovilización (A) y desorción (B) de PGA nativa y PGA8glu sobre intercambiadores aniónicos. A. Condiciones: tampón fosfato 5mM, pH 7.0 a 25°C,. B. Actividad desorbida de agarosa DEAE (■); actividad desorbida de PEI 25kDa (■). Condiciones de desorción: fosfato de sodio 5 mM pH 7.0, 25°C con concentraciones crecientes de NaCl. Actividad inicial: 20 UI/g de soporte.

### 3.2.2 Estudio de la fuerza de unión al soporte.

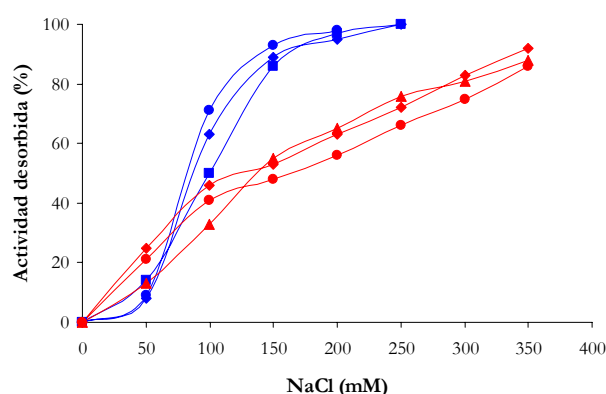
Una vez lograda la adsorción del mutante sobre agarosa DEAE y agarosa-PEI se quiso estudiar la fuerza de unión a cada uno de ellos, esperando encontrar diferencias en la adsorción ya que presentan estructuras distintas (*Introducción 2.2.1*). En la **Figura 26B** se muestra la desorción total de la PGA8glu del soporte DEAE se consiguió a una concentración de 200 mM de NaCl mientras que de la PEI 25 kDa no se desorbió completamente hasta una concentración de 400 mM de NaCl.

### 3.2.3 Estudio del envejecimiento del derivado para mejorar la adsorción

Como se ha visto en el apartado anterior no se observan grandes diferencias entre la fuerza de unión a ambos soportes por lo que se decidió estudiar el efecto que tiene el tiempo de contacto entre la enzima y el soporte (envejecimiento) en el incremento de la fuerza de unión entre ambos.

Para ello se dejan incubando a 4°C durante un periodo de tiempo los derivados enzimáticos para ver si aumentan o mejoran las interacciones electrostáticas entre el soporte y la proteína, sobre todo en el caso del soporte recubierto con el polímero de PEI.

La **Figura 27** muestra las desorciones realizadas transcurridas 48 h y 96 h tras la adsorción sobre agarosa DEAE y agarosa-PEI 25 kDa. Como muestran las curvas de desorción, no hay diferencias significativas entre la desorción realizada tras la inmovilización o las desorciones tras un periodo de tiempo. Por lo tanto no se ha logrado mejorar la fuerza de unión tras la incubación en el tiempo.



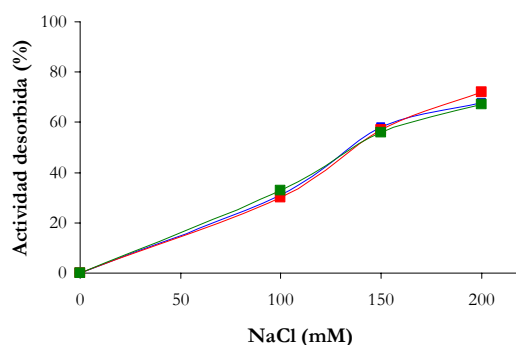
**Figura 27.**

Estudio de envejecimiento de los derivados de PGA8glu. Actividad desorbida de agarosa DEAE: 0 h (■); 48 h (●); 96 h (◆) de incubación a 4°C. Actividad desorbida de agarosa PEI 25kDa: 0 h (■); 48 h (●) y 96 h (◆) de incubación a 4°C. Condiciones: tampón fosfato 5mM, pH 7.0. Actividad inicial 15 UI/ml de soporte.

### 3.2.4 Inmovilización sobre agarosa-PEI de distintos tamaños y estudio de la fuerza de unión al soporte.

Se estudió también si el tamaño del polímero PEI unido a la agarosa afectaría a la fuerza de unión de la enzima mutada al soporte. Para ello, se inmovilizó la enzima mutada sobre el soporte agarosa recubierto con PEI de 3 tamaños diferentes: 25, 60 y 600 kDa. En los tres casos se logran rendimientos de inmovilización del 100% donde la enzima permanece activa.

Cuando se estudió la fuerza iónica necesaria para desorber la enzima de los 3 soportes se observa cómo no hay diferencias entre ellos (**Figura 28**) por lo tanto el grado de interacción con el soporte es similar, sugiriendo que la enzima no está penetrando en el soporte.

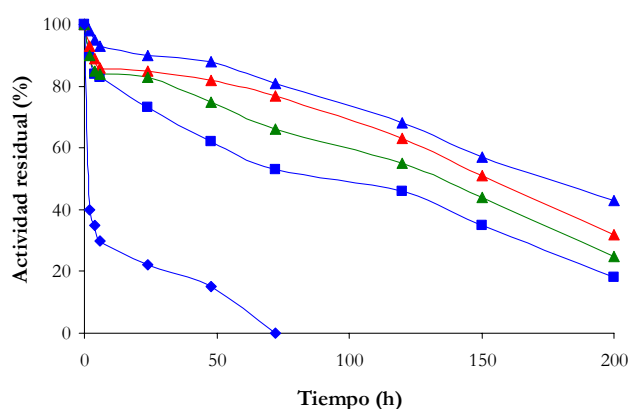


**Figura 28.**

Desorción de la PGA8glu adsorbida sobre agarosa-PEI de distintos tamaños. Actividad desorbida de agarosa PEI 25kDa (■); agarosa PEI 60kDa (■); agarosa PEI 600kDa (■). Condiciones: tampón fosfato 5mM, pH 7.0 con una actividad de 15 UI/ml de soporte.

### 3.2.5 Estabilidad frente a disolventes de los derivados PGA8glu adsorbidos sobre intercambiadores aniónicos.

Tras haber logrado la adsorción de la enzima mutada se estudió la estabilidad de dichos derivados frente a codisolventes orgánicos. El mutante de PGA inmovilizado sobre DEAE fue más estable que la enzima inmovilizada sobre agarosa BrCN donde la enzima es similar a la enzima soluble ya que está tan sólo unida a través del amino terminal (**Figura 29**). Sin embargo, los derivados más estables se alcanzaron cuando la enzima está inmovilizada sobre agarosa PEI pero no hay diferencias significativas entre los soportes de PEI de diferentes tamaños. Las vidas medias correspondientes a cada derivado fueron: 2 h para el derivado BrCN, 75 h para el derivado agarosa DEAE y 135, 150 y 170 h para los derivados agarosa-PEI 25, 60, 600 kDa, respectivamente.



**Figura 29.**

Estabilidad en 60% de dioxano (v/v) de derivados adsorbidos de PGA8glu. (♦) BrCN; (■) agarosa DEAE; (▲) agarosa-PEI 25 kDa; (▲) agarosa PEI 60 kDa y (▲) agarosa PEI 600 kDa. Actividad inicial de 15 UI/ml de soporte. Condiciones: fosfato de sodio 25 mM pH 7.0 a 4°C.

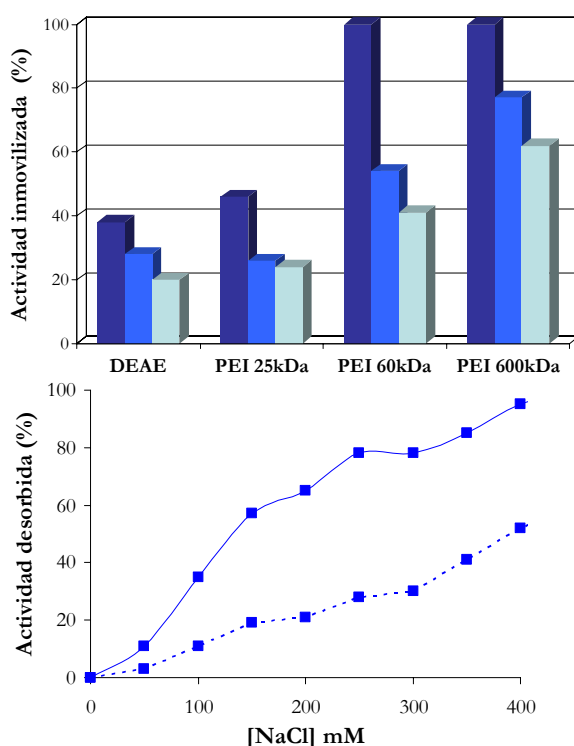
### 3.2.6 Optimización de la adsorción de PGA8glu a soportes agarosa PEI.

La moderada estabilización de la PGA inmovilizada sobre soportes recubiertos por PEI en presencia de codisolventes junto con la falta de diferencias en las propiedades del mutante adsorbido a soportes recubiertos con PEI de distinto tamaño, sugirió que la enzima no estaba penetrando en la cama polimérica de PEI, y que sólo estaba interactuando con la capa superficial de grupos iónicos. Se establecería así una interacción bidimensional y no tridimensional como cabría de esperar.

Una estrategia para aumentar la fuerza de adsorción entre la enzima y el soporte sería llevar a cabo la inmovilización en presencia de una fuerza iónica elevada (Pessela *et al.*, 2005). Bajo estas condiciones más restrictivas se estaría forzando la unión de la enzima al soporte y sólo aquellas moléculas de enzima capaces adsorberse por varios puntos de la superficie lograrían embeberse en el polímero.

Para mejorar las propiedades de la PGA8glu inmovilizada sobre soportes de tipo PEI, se modificaron las condiciones de inmovilización a unas menos favorables para su adsorción aprovechando las características de la enzima mutada así como el uso de un intercambiador iónico fuerte. De esta forma, las adsorciones se realizaron a un pH más bajo y a una fuerza iónica mayor (**Figura 30**). A pH 5.0, la adsorción de la enzima mutada se redujo significativamente sobre el DEAE (la adsorción supuso menos del 40% del total de la enzima ofrecida) y se observa también como a mayor fuerza iónica se redujo el porcentaje de enzima adsorbida. La adsorción sobre soportes recubiertos con PEI de 25 kDa bajo las mismas condiciones produjo resultados parecidos aunque la adsorción fue ligeramente superior que sobre agarosa DEAE.

Cabe destacar que el uso de PEI de mayor tamaño (60 kDa o 600 kDa) conllevó a un aumento progresivo del porcentaje de enzima inmovilizada; de hecho, al utilizar el polímero de mayor tamaño, más del 60% de la enzima se logró adsorber a pH 5.0 y en presencia de 150 mM NaCl. La **Figura 31** muestra que el mutante adsorbido en estas condiciones necesita mucha mayor concentración de NaCl para ser desorbido de la agarosa PEI que cuando fue adsorbido en las condiciones estándar (pH 7.0, sin NaCl). La concentración de NaCl que se necesita para liberar el 50% de la enzima del soporte aumenta de 150 mM a 400 mM.



**Figura 30.**

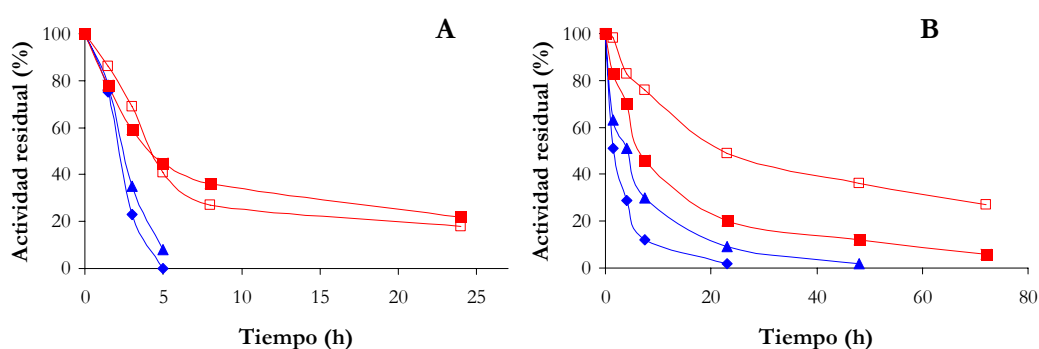
Inmovilización a pH 5.0 de PGA8glu sobre intercambiadores aniónicos en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. (■) 25mM NaCl; (■) 100mM NaCl y (■) 150mM NaCl. Los experimentos se llevaron a cabo en 25mM de acetato de sodio pH 5.0 a 25°C. Actividad inicial 10 UI/ml de soporte.

**Figura 31.**

Desorción de la PGA8glu adsorbida sobre agarosa PEI 600kDa en distintas condiciones de inmovilización. (—■—) PGA8glu desorbido a pH 7.0; (---■---) PGA8glu adsorbido a pH 5.0 y 150mM de NaCl. Condiciones: tampón fosfato 5mM, pH 7.0 a 25°C. Actividad inicial: 10 UI/ml de soporte.

También es interesante destacar que la PGA8glu adsorbida bajo estas nuevas condiciones se convierte en un derivado mucho más estable en presencia de codisolventes orgánicos (**Figura 32A**), aunque la estabilidad térmica de ambos derivados es similar (**Figura 32B**).

Por lo tanto, bajo estas condiciones, parece que la PGA8glu es capaz de penetrar en mayor profundidad bajo la red de la PEI. De esta forma, una mayor área de la superficie interacciona con el polímero, generando una adsorción más fuerte y una estabilización mayor frente a codisolventes orgánicos.



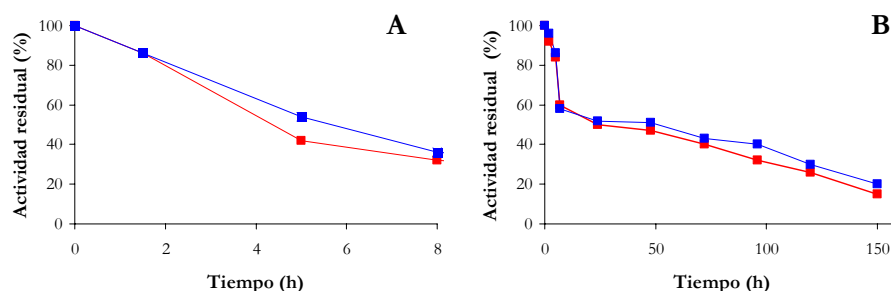
**Figura 32.** Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) de los derivados de PGA8glu. (◆) PGA8glu inmovilizado sobre agarosa BrCN; (▲) PGA8glu inmovilizado sobre DEAE a pH 7.0. (■) PGA8glu inmovilizado sobre agarosa PEI 600 kDa a pH 7.0; (□) PGA8glu inmovilizado sobre agarosa PEI 600 kDa a pH 5.0 y en presencia de 150 mM NaCl. A. Condiciones: 55°C en fosfato de sodio pH 7.0. B. Condiciones: 75%(v/v) dioxano en 25 mM de acetato de sodio pH 7.0 a 4°C.

### 3.3 Nuevos derivados de PGA coinmovilizada con PEI.

Como se ha visto en Resultados 3.2.1., la enzima PGA nativa no es retenida en el polímero PEI. Gracias al aumento en el número de glutámicos en el nuevo mutante sí se ha logrado esta interacción. Debido a la gran capacidad de estabilización que se logra con la unión covalente multipuntual a soportes agarosa glioxil y aprovechando esta nueva capacidad del mutante PGA8glu de interaccionar con el polímero se diseñaron nuevos derivados enzimáticos.

#### 3.3.1 Inmovilización de la PGA nativa y la PGA8glu sobre soportes agarosa glioxil.

La inmovilización de las proteínas sobre este soporte se basa en la reacción de los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas (*Introducción*, Fig. 4) con la capa de aldehídos activados sobre la superficie de la agarosa (Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2005). El nuevo mutante obtenido,



**Figura 33.** Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) de PGA nativa y PGA8glu inmovilizadas sobre agarosa glioxil. (■) PGA nativa; (■) PGA8glu. A. Condiciones: 65°C en 25mM de fosfato pH 7.0. B. Condiciones 75% dioxano (v/v) en 25mM fosfato de sodio pH 7.0 a 4°C.

PGA8glu, no tendría alterada su capacidad de unión a dicho soporte en comparación con la PGA nativa ya que los glutámicos introducidos no participarían en la reacción y ninguna de sus lisinas superficiales ha sido sustituida por otro aminoácido.

Tanto la enzima nativa como la mutada se inmovilizaron sobre agarosa glioxil en menos de 30 minutos y la actividad enzimática permaneció inalterada, logrando actividades recuperadas de más del 90% en los dos casos.

La **Figura 33** muestra como ambos derivados enzimáticos presentan casi una estabilidad similar tanto térmica como en codisolventes. Por lo tanto en ambos casos se demostraría que sólo los grupos amino de la proteína están involucrados en la unión al soporte sin que las mutaciones afecten al transcurso de la inmovilización o a la estabilidad.

### 3.3.2 Preparación de un derivado agarosa glioxil-PGA8glu recubierto con PEI.

Tras haber visto que la introducción de las nuevas mutaciones no afecta ni a la inmovilización de la enzima mutada sobre el soporte agarosa glioxil ni a su estabilidad, se estudió el efecto de recubrir dichos derivados con PEI de distintos tamaños.

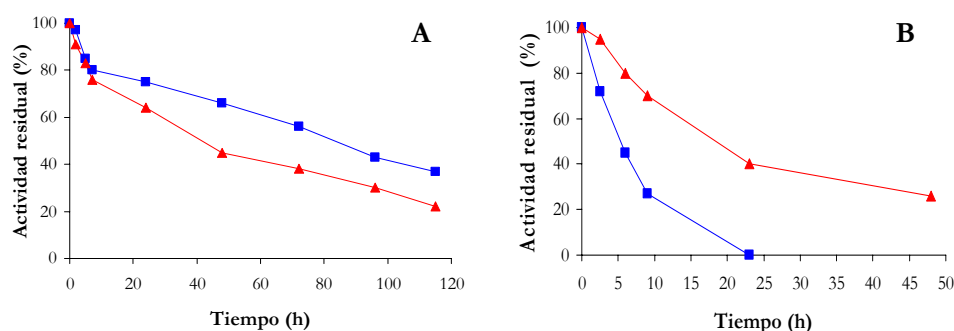
En esta estrategia, una vez que la enzima es inmovilizada sobre el soporte agarosa glioxil, los grupos aldehído del soporte que no han reaccionado con la enzima se reducen con borohidruro sódico. Después se añade el polímero de PEI dejándolo interaccionar con el derivado enzimático. Al agregar el polímero, los grupos amino de la PEI son incapaces de reaccionar con los grupos reducidos de la agarosa por lo tanto el polímero sólo se incorporaría al derivado por adsorción sobre la superficie proteica y no se produciría la unión covalente entre el polímero y el soporte.

Derivado enzimático	$\mu\text{mol/g}$ de soporte <sup>a</sup>
Agarosa glioxil-PGA nativa	0.045
Agarosa glioxil-PGA nativa-PEI 600kD	0.043
Agarosa glioxil-PGA 8glu	0.044
Agarosa glioxil-PGA 8glu-PEI 25kD	0.114
Agarosa glioxil-PGA 8glu-PEI 60kD	0.125
Agarosa glioxil-PGA nativa-PEI 600kD	0.190

**Tabla 4.** Inmovilización de PGA8glu sobre soportes tipo agarosa recubiertos con PEI de distinto tamaño. Actividad ofrecida al soporte 10 UI/ml de soporte. <sup>a</sup> Cuantificado con TNBS (*Material y Métodos*, 7.3).

La **Tabla 4** muestra la cuantificación de los grupos amino detectados en los derivados. En primer lugar, se puede observar como el derivado glioxil-PGA nativa recubierta con PEI presenta un valor similar a los derivados control (PGA nativa o PGA mutada inmovilizada sobre glioxil), mientras que los derivados de la enzima mutada recubierta con PEI presentan un aumento en el número de grupos amino. En segundo lugar, también se puede apreciar como a medida que aumenta el tamaño del polímero adsorbido a la enzima también se incrementan el número de aminos detectados.

Se estudió si estos derivados presentaban una mejor estabilidad que los derivados glioxil preparados anteriormente. La **Figura 34** muestra la estabilidad térmica y en codisolventes de los derivados de PGA8glu recubiertos con PEI. En estabilidad térmica no se observan diferencias entre ambos derivados enzimáticos (**Figura 34A**), sin embargo, se mejoró en un factor de 3 la estabilización entre el derivado recubierto con PEI y el derivado glioxil-PGA8glu sin recubrir (**Figura 34B**) frente a codisolventes.



**Figura 34.** Cursos de estabilidad térmica (A) y en codisolvente (B) del derivado agarosa glioxil-PGA8glu recubierto con PEI 600 kDa. (■) Agarosa glioxil PGA8glu (control); (▲) Agarosa glioxil PGA8glu recubierta con PEI 600kDa. A. Condiciones: 65°C en 25mM de fosfato pH 7.0. B. Condiciones 75%(v/v) de dioxano en 25mM fosfato de sodio pH 7.0 4°C.

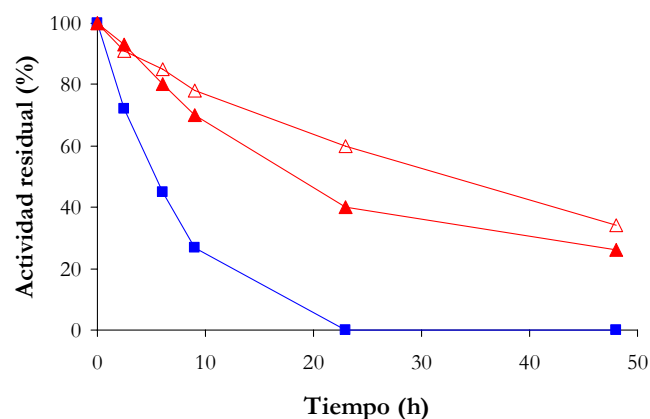


### 3.3.3 Preparación de un derivado agarosa glioxil-PGA8glu coinmovilizado con PEI.

Una segunda estrategia para mejorar los derivados anteriores inmovilizados sobre agarosa glioxil y recubiertos con PEI fue la co-inmovilización covalente de la enzima con el polímero y con el soporte agarosa glioxil.

En este caso, primero se inmovilizaría el mutante PGA8glu sobre agarosa glioxil y antes de reducir con borohidruro sódico los enlaces enzima-soporte y los aldehídos que queden en el soporte se añadiría la PEI. De esta forma, la PEI podría reaccionar covalentemente con los aldehídos remanentes del soporte, estando en contacto con la superficie de la enzima inmovilizada.

Este nuevo derivado presentó una estabilidad frente a codisolventes mayor que el derivado recubierto de PEI (**Figura 35**). Este resultado sugiere que ahora, utilizando la PEI de mayor tamaño (600 kDa) y co-inmovilizándolo con el soporte y la enzima, el polímero ha sido capaz de interaccionar y cubrir toda la superficie proteica generando un entorno hidrofílico que protege a la enzima al disminuir la concentración efectiva de codisolvente en el entorno de la enzima protegiéndola de su inactivación.

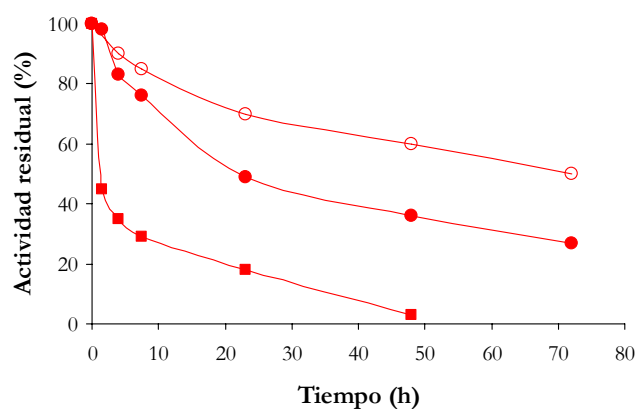


**Figura 35.** Curso de estabilidad frente a disolvente de los derivados glioxil-agarosa PGA8glu coinmovilizado con PEI. (■) Agarosa glioxil-PGA8glu; (▲) Agarosa glioxil-PGA recubierto con PEI 600 kDa. (△) Agarosa glioxil-PGA8glu co-inmovilizado con PEI 600 kDa. Condiciones: 75%(v/v) en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0 a 4°C. Actividad inicial de 12 UI/ml.

### 3.4 Estudio de la estabilidad frente a codisolventes de los distintos derivados obtenidos con PGA8glu.

Después de obtener distintos tipos derivados de PGA8glu gracias a su interacción con el polímero catiónico PEI mediante diversos métodos de inmovilización, se decidió comparar dichos derivados entre ellos para determinar qué método de inmovilización desarrollado lograba un factor de estabilización mayor frente a codisolventes.

La **Figura 36** muestra la estabilidad de los distintos derivados obtenidos con el mutante PGA8glu en presencia de dioxano. Se logra una gran estabilización tanto por adsorción de la enzima al soporte agarosa recubierta con PEI como cuando se co-inmoviliza covalentemente al soporte agarosa glioxil. La vida media de la enzima pasa de 1 h cuando la enzima está inmovilizada sobre agarosa BrCN (derivado que sería similar a la enzima soluble) a 23 h en el caso de la enzima adsorbida sobre agarosa-PEI y 72 h en el caso de la co-inmovilizada. Por lo tanto, se obtiene un derivado de PGA8glu co-inmovilizada con PEI 36 veces más estable que la enzima en el derivado control.



**Figura 36.** Curso de estabilidad frente a codisolvente de los derivados de PGA8glu obtenidos mediante distintos protocolos. (■) Agarosa-BrCN-PGA8glu; (●) Agarosa PEI 25 kDa-PGA8glu; (○) Agarosa glioxil-PGA8glu co-inmovilizada con PEI 600kDa. Condiciones: 75%(v/v) de dioxano en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0 a 4°C.

#### **4. AUMENTO DEL NÚMERO DE GRUPOS NUCLEÓFILOS EN LA SUPERFICIE DE LA PGA DE *E. coli* POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**

##### **4.1 Generación de nuevas zonas en la superficie proteica para lograr la inmovilización covalente multipuntual.**

En la inmovilización covalente, la reacción entre la enzima y el soporte se establece a través de determinados residuos en la enzima que son capaces de reaccionar con grupos activados en el soporte bajo condiciones experimentales concretas. Así por ejemplo, en la inmovilización sobre resinas activadas con grupos epóxidos, los grupos nucleófilos de la proteína (-OH; -SH; -NH<sub>2</sub>) son capaces de reaccionar con los grupos epóxidos del soporte dando lugar a una unión covalente multipuntual que permite la estabilización de proteínas (López-Gallego *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2002).

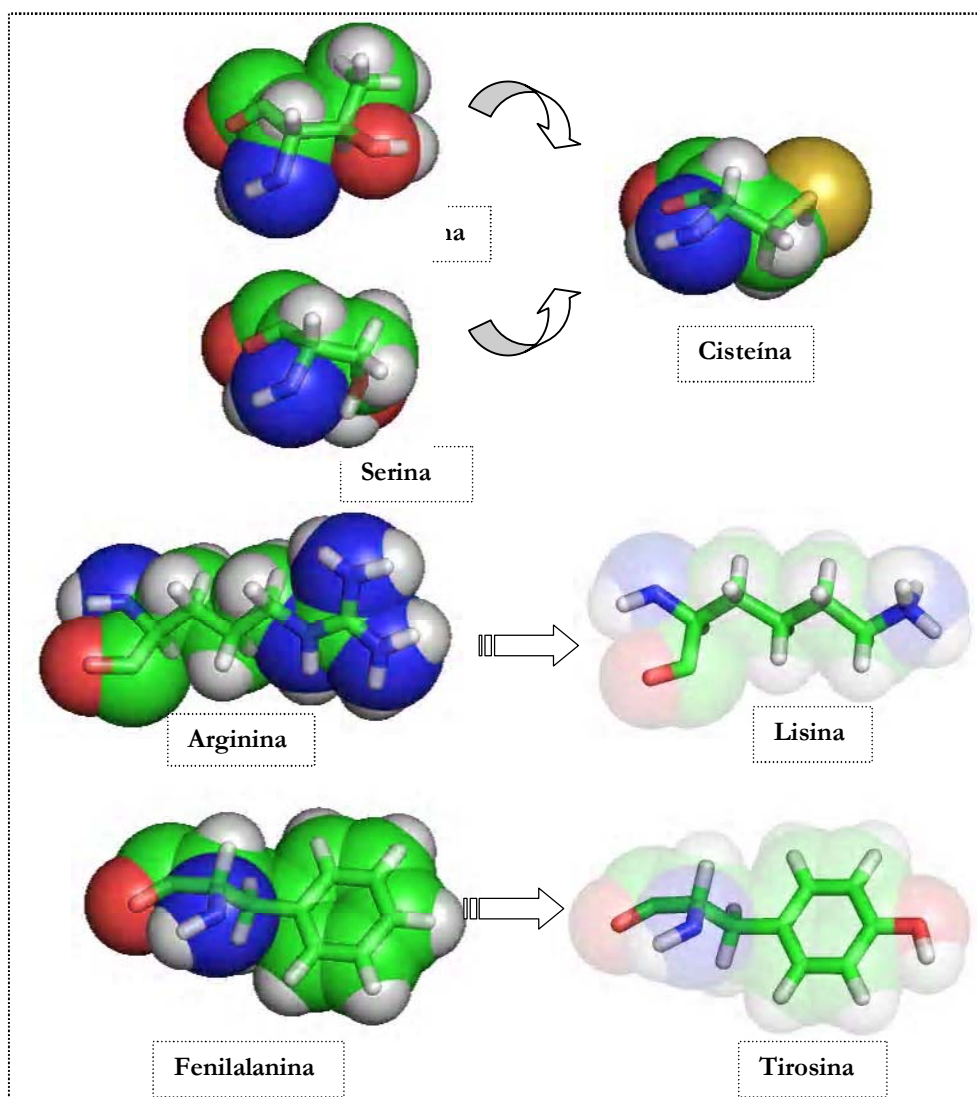
Aprovechando como herramienta la mutagénesis dirigida, se quiso explorar nuevas zonas de la superficie de PGA que, en principio, nunca se hayan visto involucradas anteriormente en procesos de inmovilización por no presentar los residuos adecuados para reaccionar con el soporte. Para ello, se introdujo una cisteína en zonas por donde la enzima es incapaz de reaccionar con el soporte y a su vez se enriqueció en residuos nucleofílicos capaces de generar una unión covalente multipuntual.

##### **4.1.1 Diseño y selección de los residuos a mutar.**

Para diseñar los nuevos mutantes se buscaron zonas en la superficie de la proteína que presentasen las siguientes características:

1. Zonas libres de residuos nucleófilos capaces de reaccionar con los grupos epóxido del soporte, es decir, zonas que no presentaran lisinas, cisteínas o tirosinas.
2. Zonas que contengan residuos ser/thr para poder introducir una cisteína por la que dirigir la inmovilización. La PGA de *E. coli* no presenta ninguna cisteína en su estructura (Hunt *et al.*, 1990). Lo que se pretende al introducir dicha cisteína es dirigir la primera parte del proceso de inmovilización por ese residuo para asegurar que la proteína se está orientando por una nueva zona de inmovilización imposible anteriormente.

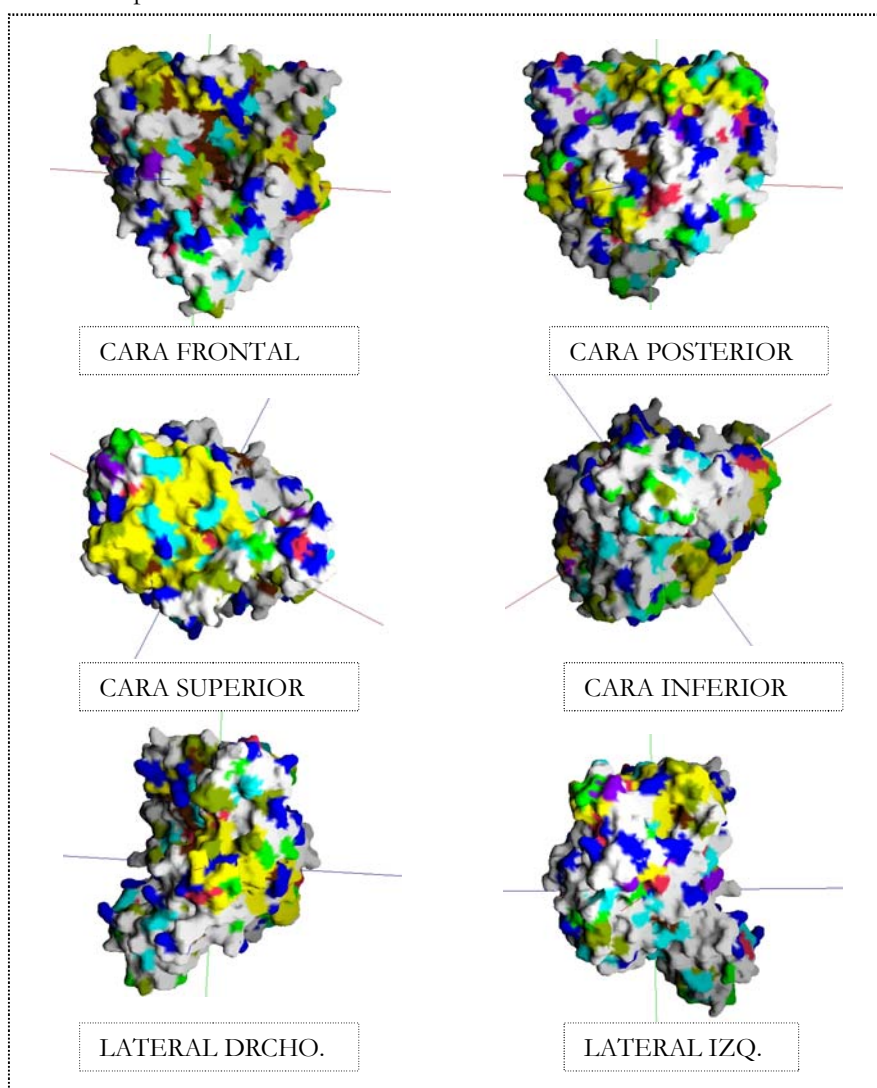
3. Las mutaciones deben ser lo más conservadoras posibles para que en principio no afecten a la estructura tridimensional de la enzima. En este caso se seleccionaron argininas que serán mutadas a lisinas, fenilalaninas a tirosinas y una serina o threonina a cisteína (**Figura 37**).
4. Seleccionar residuos que estuviesen lo más expuestos en la superficie de la proteína para una mejor interacción con el soporte.



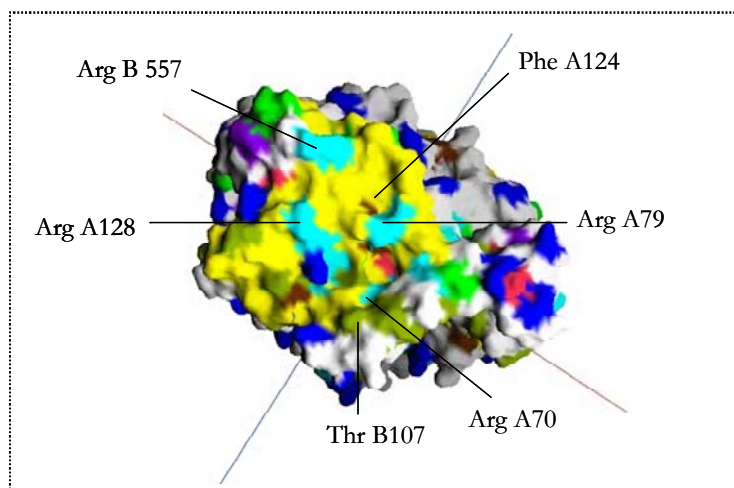
**Figura 37.** Estructura de los aminoácidos seleccionados para obtener los mutantes de PGA enriquecidos en aminoácidos nucleofílicos. Como se observa en el dibujo, se pretende conservar la estructura y tamaño del aminoácido introduciendo una única carga negativa adicional en el radical del aminoácido. Código de colores azul N, rojo O, blanco H, amarillo S. Obtenido con Pymol versión 0.99.

En la **Figura 38** se muestran distintas perspectivas de la superficie de la PGA. La lisina (azul oscuro) es el nucleófilo más abundante en su superficie mientras que otros nucleófilos de menor reactividad como tirosinas, histidinas o serinas se encuentran en una proporción inferior.

Tras analizar la superficie se han encontrado dos zonas que cumplen los requisitos que se habían propuesto para el diseño de los nuevos mutantes: una primera zona localizada en la cara superior próxima al centro activo y otra en una zona de la cara posterior de la proteína.

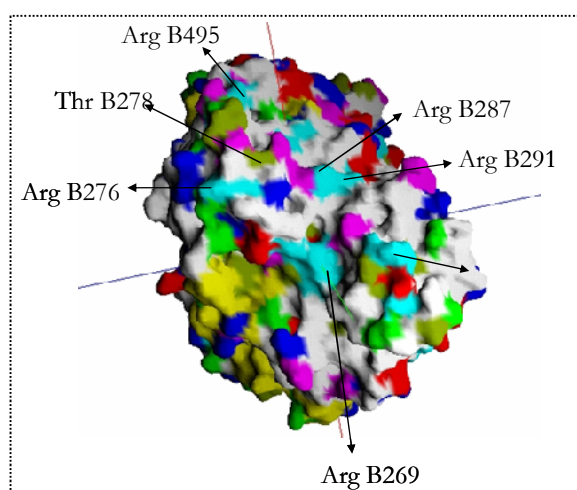


**Figura 38.** Distintas perspectivas de la superficie de la PGA. Nucleófilos: lisinas (azul); tirosinas (rosa); histidinas (violeta). Nucleófilos potenciales: argininas (celeste), fenilalaninas (marrón), serinas (verde claro) threoninas (verde oscuro).



**Figura 39.** Representación en Grasp de los aminoácidos seleccionados en la zona superior de la PGA para ser mutados. Azul claro: arg; verde oscuro: thr; rosa: his; phe: marrón; verde claro: ser; azul oscuro: lisinas. La subunidad  $\alpha$  de la PGA aparece en amarillo.

Se decidió diseñar el primer mutante en la zona superior de la enzima (**PGAsup**). Dicha zona presenta varias argininas que pueden ser mutadas por lisinas, fenilalaninas para ser mutadas por tirosinas y serinas/threoninas para introducir la cisteína. La **Figura 40** muestra los residuos que fueron elegidos para mutar. La zona está principalmente localizada en la subunidad  $\alpha$  de la PGA (amarillo) aunque también se insertaron dos mutaciones en la cadena  $\beta$ , thrB107cys y argB557lys.



**Figura 40.** Representación en Grasp de los aminoácidos seleccionados en la zona posterior de la PGA para ser mutados. Azul claro: arg; verde oscuro: thr; rosa: his; Phe: marrón; verde claro: ser; azul oscuro: lisinas. La subunidad  $\alpha$  de la PGA aparece en amarillo.

La zona posterior de la PGA se eligió como otra región para obtener un segundo mutante (**PGAp<sub>ost</sub>**). Al igual que la zona superior, esta nueva zona presenta unas características adecuadas para introducir nuevos nucleófilos ya que de forma natural carece de ellos. A diferencia de la otra zona elegida, las mutaciones en ésta se localizan principalmente en la subunidad  $\beta$  de la PGA. (**Figura 40**). En esta región no se encontraron fenilalaninas suficientemente expuestas para ser reemplazadas por tirosinas así que las mutaciones elegidas fueron argininas por lisinas, además de la mutación ThrB278Cys que permitirá dirigir la inmovilización por este residuo.

El mutante de la zona superior (PGAsup) contiene un total de seis mutaciones y el de la zona posterior (PGAp<sub>ost</sub>) siete. En ambos casos también se obtendrán los “mutantes control” cuya única mutación que presentan es la cisteína para dirigir la inmovilización y compararlos con sus respectivos mutantes que además de la cisteína estarán enriquecidos en otros residuos nucleófilos.

#### 4.1.2 Análisis del efecto de las mutaciones en la estructura tridimensional de la PGA.

Al igual que para el mutante de PGA que contenía 8 glutámicos (PGA8glu), como paso previo a la obtención real de los mutantes, se realizó un estudio a través de simulación por dinámica molecular con el programa X-PLOR (Brünger *et al.*, 1990), para ver si las mutaciones elegidas afectarían a la conformación de la enzima.

En primer lugar se obtuvieron los mutantes virtualmente que contienen únicamente la cisteína, PGAcysB107 y PGAcysB278, utilizando el programa O (Jones *et al.*, 1991), se aplicó a cada mutante el protocolo de dinámica molecular validado con la enzima ferredoxin reductasa de *Anabaena* PCC7119 (FNR) (Abián, 2003).

Una vez obtenida la estructura tridimensional del mutante, se comparó con la estructura de la enzima nativa obteniendo un grado de superposición muy bueno. Para confirmar este resultado se analizó cuantitativamente el grado de superposición calculando la diferencia en las desviaciones cuadráticas medias de los mutantes y de la PGA nativa. Se obtuvo un valor de r.m.s.d. 0.156 de Å, correspondiente a la diferencia obtenida entre los carbonos  $\alpha$  de ambas estructuras. Después de realizar las mutaciones virtualmente para los mutantes que contienen únicamente la cisteína, se repitió el mismo protocolo para los dos mutantes (PGAsup) y (PGAp<sub>ost</sub>), obteniéndose también buenas superposiciones de ambas estructuras con la enzima nativa. Los valores de r.m.s.d. obtenidos fueron 0.175 Å y 0.163 Å para PGAsup y PGAp<sub>ost</sub>, respectivamente.

#### 4.1.3 Producción, purificación y caracterización de los mutantes PGAsup y PGApst.

Tras realizar el estudio teórico, observando que las mutaciones en principio no alteran la estructura tridimensional de los mutantes, se procedió a su obtención mediante mutagénesis dirigida.

Las mutaciones se introdujeron como se ha descrito en *Material y Métodos 9.5.2*, mediante distintas rondas de PCR sobre el gen *pac* de la penicilina G acilasa de *E. coli* ATCC 11105 clonado en el vector de expresión pEt101/D-TOPO (pOAF) (Abián, 2003).

Tras secuenciar los nuevos plásmidos (pPGAcysB107, pPGAsup, pPGAcysB276 y pPGApst) para comprobar la presencia de todas las mutaciones deseadas, se transformaron células hiperexpresoras BL21 de *E. coli* para obtener los distintos mutantes.

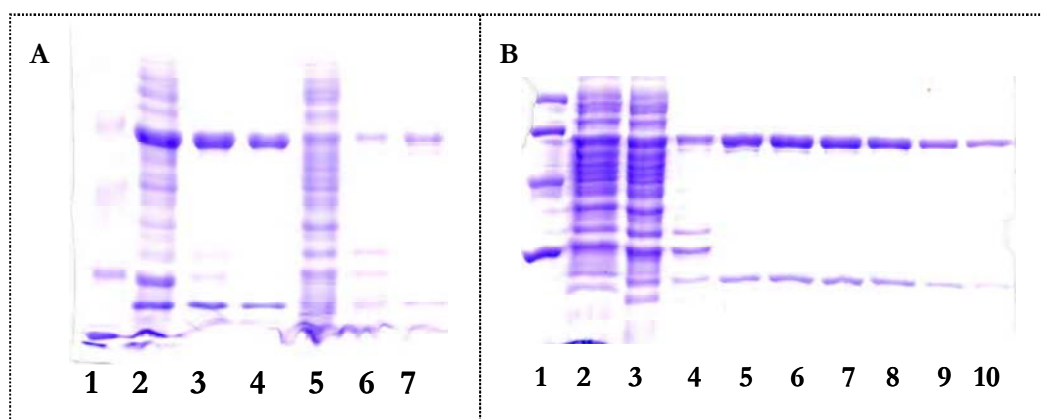
En la **Tabla 5** se muestran las purificaciones correspondientes a los distintos mutantes. El patrón de expresión del mutante PGAcysB107 es similar a la enzima nativa PGA (capítulo anterior) mientras que la enzima PGAsup que contiene las 6 mutaciones presenta una actividad específica menor (16 UI/mg) partiendo de volumen similar de cultivo. Las mutaciones introducidas parece que afectan a la expresión de este mutante PGAsup.

	Proteína total (mg) <sup>a</sup>	Actividad total (IU) <sup>b</sup>	Actividad específica (IU/mg)	Actividad recuperada (%)	Factor de Purificación
<b>PGAcysB107</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	343	1120	3.27	100	
Purificada	11	322	29	29	9
<b>PGA sup</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	197	128	0.65	100	
Purificada	2.5	40	16	31	8.5
<b>PGAcysB278</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	453	1260	2.8	100	
Purificada	9	308	33	24	12
<b>PGAcysB278</b>					
Extracto crudo <sup>c</sup>	244	1400	5.7	100	
Purificada	5	28	29	10	5

**Tabla 5.** Purificación del mutante cys B107, PGAsup, PGAcys 278 y PGApst. La concentración de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (1978) utilizando albúmina como estándar.<sup>b</sup> La actividad enzimática total se determinó mediante el ensayo con NIPAB como se describe en Métodos.<sup>c</sup> Extracto crudo es la fracción de sobrenadante después de sonicar las células BL21 de *E. coli*.

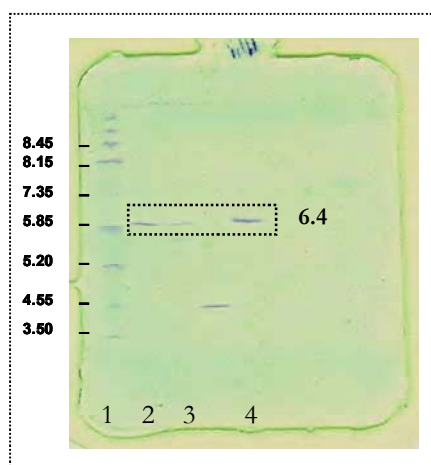


Al igual que en el caso anterior la introducción de un único residuo de cisteína no afecta a la producción de la enzima ( $AE=33$  mg/ml). El mutante PGAp<sub>ost</sub> no se logró producir activo tras introducir la última mutación argB287lys. A pesar de que la modelización de la mutación no predijo ningún efecto sobre la estructura, el mutante no se procesó correctamente. Por lo tanto se trabajó con el mutante de la zona posterior con una mutación menos de las diseñadas (6 mutaciones excepto la argB287lys). Los resultados obtenidos tras la purificación muestran como la actividad específica es similar a la de la enzima que contiene sólo la cisteína y a la de la enzima nativa.



**Figura 42.** Purificación de PGAcysB107 y PGAsup (A) y PGAp<sub>st</sub> (B).

- A. Carril 1: marcadores; carril 2: sobrenadante del extracto sonificado PGAcysB107. Carril 3: sobrenadante tras PEI 25kD PGAcysB107; carril 4: fracción recogida por FPLC tras la desorción de Q sepharosa PGAcysB107. Carril 5: sobrenadante del extracto sonificado PGAsup. Carril 6: sobrenadante tras PEI 25kD PGAsup; carril 7: fracción recogida por FPLC tras la desorción de Q sepharosa PGAsup.
- B. Carril 1: marcadores; carril 2: sobrenadante del extracto sonificado. Carril 3: sobrenadante tras diálisis; carril 4: sobrenadante tras paso por agarosa PEI 25kD pH 8.0. Carril 5-10: distintas fracciones recogidas por FPLC tras la desorción de Q sepharosa a pH 8.5.



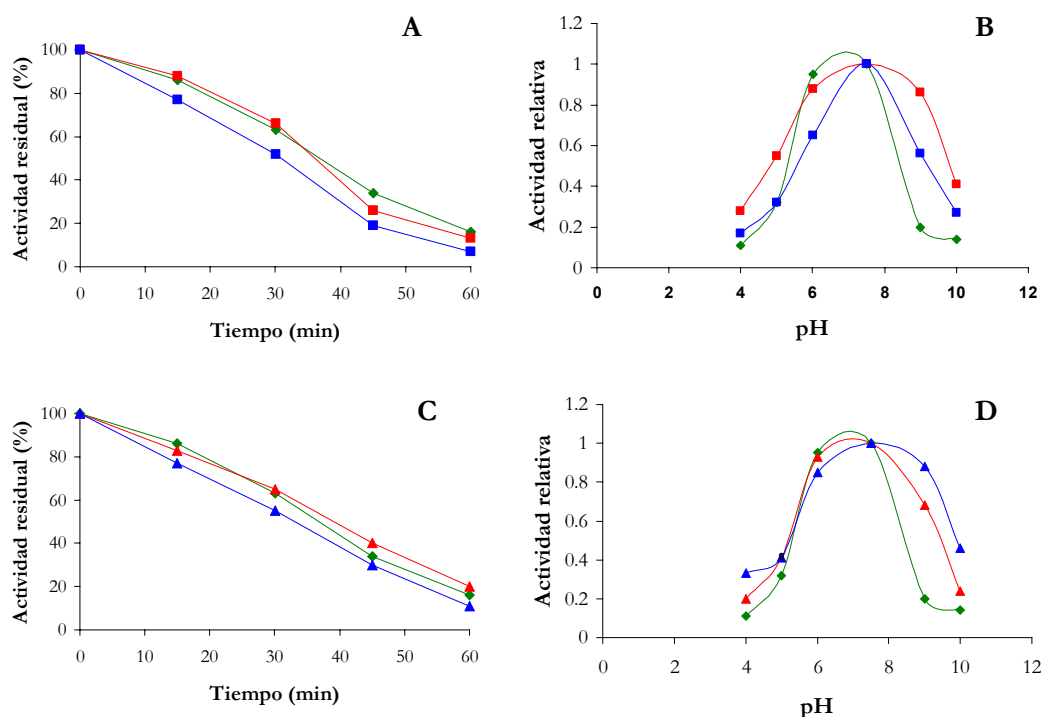
**Figura 43.**

Determinación del punto isoelectrico (pI) de PGAsup y PGAp<sub>st</sub>.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo mediante Pharmacia Phast System en un PhastGel® IEF pH 3-9. Carril 1: pI Calibration kit pH 3-9; carril 2: PGAsup; carril 3: PGAp<sub>st</sub>; carril 4: PGA nativa. El punto isoelectrico tanto de los mutantes como de la enzima nativa se estimó a partir de su posición relativa frente a los estándares de pI.

En la **Figura 41** se muestra, a modo de ejemplo, el análisis por SDS-PAGE de las distintas fracciones purificadas del mutante PGApóst según el protocolo descrito en *Material y Métodos* 10.2. Para los otros mutantes se obtuvieron patrones de electroforesis similares. No se observaron diferencias en el valor del punto isoeléctrico de los mutantes PGAsup y PGApóst con respecto a la enzima nativa (**Figura 42**).

Se estudió el efecto de las mutaciones en la estabilidad térmica de la enzima soluble así como en la actividad en un rango de pH de 4 a 10. Como muestra la **Figura 43A**, tanto la enzima PGAcysB107 como la enzima PGAsup presentan una estabilidad térmica a 55°C y pH 7.0 parecida a la de la enzima nativa. Del mismo modo, el perfil de la curva actividad-pH en ambos mutantes con respecto a la PGA nativa también es similar (**Fig. 43B**), mostrando su actividad óptima a pH 7.5. La estabilidad térmica es similar entre la enzima nativa, el mutante con una mutación, PGAcysB276, y el mutante PGApóst (**Fig. 43C**). En las curvas de actividad-pH se observa un aumento en la actividad de los mutantes en valores de pH alcalinos (**Fig. 43D**).



**Figura 43.** Estabilidad térmica (A y C) y perfil actividad-pH (B y D) de PGAsup PGAcysB107, PGApóst y PGAB276. (A y C) Condiciones 55°C en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0. (B y D) Curva de actividad-pH utilizando NIPAB como sustrato a 25°C. Actividad relativa indica la actividad expresada a pH 7.0.

(◆) PGA nativa, (■) PGAsup, (■) PGAcysB107, (▲) PGApóst y (▲) PGAcysB276.

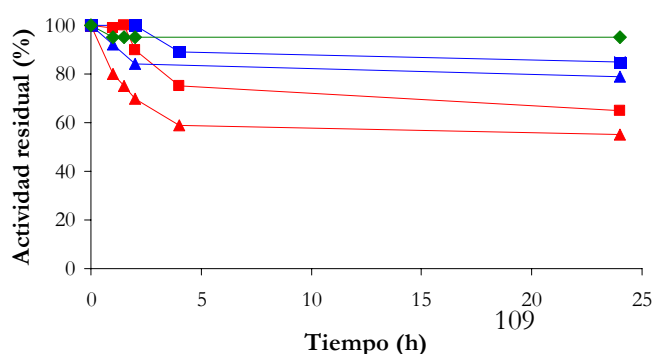
## 4.2 Inmovilización covalente multipuntual de los mutantes PGAsup y PGApst.

Una vez obtenidos las enzimas mutadas en ambas zonas, (convertidas ahora en zonas por las que es posible orientar la inmovilización) se procedió al estudio de la inmovilización de estos mutantes sobre distintos soportes con grupos capaces de reaccionar con los aminoácidos introducidos.

### 4.2.1 Inmovilización covalente sobre Eupergit epóxido.

Como se ha comentado anteriormente, el protocolo convencional para la inmovilización de la PGA sobre soportes epóxido se realiza a pH neutro y a muy alta fuerza iónica (Mateo *et al.*, 2000a). Tras una primera adsorción hidrofóbica tiene lugar la unión covalente con el soporte pero, debido a la baja reactividad de los nucleófilos de la enzima a dicho pH (principalmente las lisinas), no se promueve una unión multipuntual muy intensa. La introducción de una cisteína en la superficie de la proteína va a permitir, por un lado orientar la inmovilización por esa zona y por otro, lograr una primera unión covalente a pH neutro y sin necesidad de una alta fuerza iónica puesto que la cisteína introducida será capaz de reaccionar con los epóxidos del soporte (Grazú, 2006). Una vez la enzima está inmovilizada por la cisteína, el derivado se incubará a pH 10.0 para permitir que las lisinas y otros nucleófilos reaccionen ya que a este pH su reactividad como nucleófilos será mayor (Introducción, Fig. 10).

La **Figura 44** muestra la cinética de inmovilización de los distintos mutantes sobre el soporte Eupergit a pH 7.0. En ambos casos los mutantes que contienen sólo la cisteína logran rendimientos de inmovilización mayores que los otros mutantes. La enzima nativa apenas se inmoviliza sobre el soporte. Una vez logrado el máximo rendimiento de inmovilización tras 24 h, los derivados se incubaron a pH 10.0 durante 48 h para promover la reacción de las lisinas.



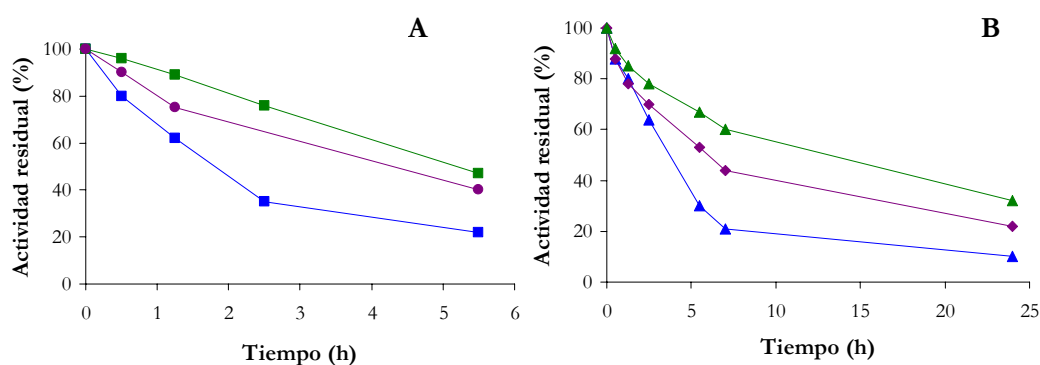
**Figura 44.**

Cinética de inmovilización de los mutantes enriquecidos en nucleófilos sobre soportes Eupergit. (◆) PGA nativa; (▲) PGAcysB276; (△) PGAcysB107; (■) PGAsup; (◼) PGApst. Condiciones: fosfato de sodio 25mM pH 7.0 y 25°C.

Enzima	Condiciones de inmovilización tras 24h a pH7 sobre Eupergit	Inmovilización% tras 24h	Actividad expresada (UI/g de soporte)
PGA nativa	pH10 48h	5	1
PGAcysB107 (control)	Soporte bloqueado con gly	38	8
PGAcysB107	pH10 48h	15	10
PGAsup	pH10 48h	45	6
PGAcysB278 (control)	Soporte bloqueado con gly	21	12
PGAcysB278	pH10 48h	45	13
PGApóst	pH10 48h	21	8

**Tabla 6.** Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre Eupergit. Actividad inicial: 14 UI/ml.

También se preparó un derivado control que presentase la enzima unida tan sólo a través del grupo SH de la cisteína introducida. Para preparar este derivado, tras obtener el máximo porcentaje de actividad inmovilizada de los mutantes PGAcysB107 y PGAcysB276 transcurridas 24 h, se bloquearon con glicina los epóxidos remanentes en el soporte. La **Tabla 6** muestra los rendimientos de inmovilización y las actividades expresadas de los distintos derivados enzimáticos preparados. La cantidad de enzima inmovilizada en el caso de los mutantes PGAsup y PGApóst, siempre fue menor que sus correspondientes mutantes con sólo la cisteína introducida.

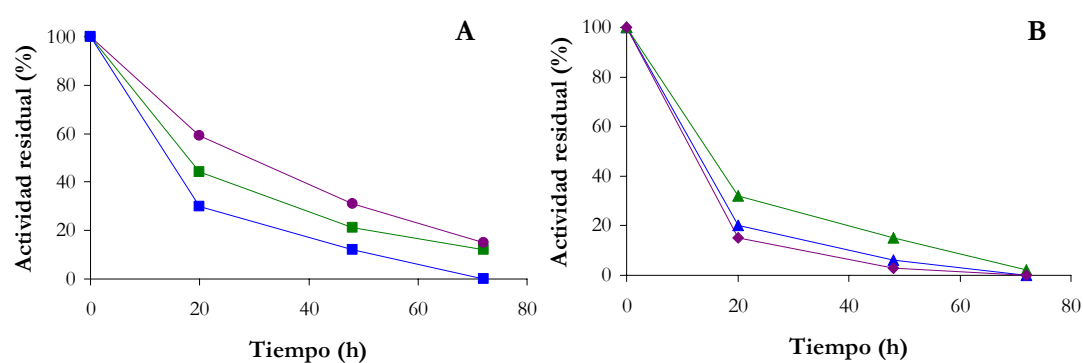


**Figura 45.** Curso de inactivación térmica de los derivados Eupergit-PGAsup (A) y Eupergit-PGApóst (B). (■) Eupergit-PGAcysB107 (control); (■) Eupergit-PGAcysB107 inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (●) Eupergit-PGAsup inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (▲) Eupergit-PGAcysB276 (control); (▲) Eupergit-PGAcysB276 inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (◆) Eupergit-PGApóst inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0. Condiciones: 55°C en 25mM fosfato de sodio.

Se estudió la estabilidad de los nuevos derivados en distintas condiciones. La **Figura 45A** muestra el curso de inactivación a 55°C y pH 7.0 de los derivados del mutante PGAsup y PGAcysB107 sobre Eupergit. El derivado control, (PGAcysB107 inmovilizada sólo a través de la cisteína) presenta una estabilidad menor que el derivado de PGAcysB107 incubado además a pH 10. Esto sugiere que los residuos nucleófilos naturales de la enzima están reaccionando con los epóxidos del soporte. El derivado de PGAsup presenta una ligera estabilidad de 3.3 veces mayor que el derivado control PGAcysB107; si se compara con el derivado PGAcysB107 incubado a pH 10 éste presenta una ligera estabilidad superior.

La estabilidad térmica de los derivados de PGApóst (**Figura 45B**) presenta una tendencia similar a los derivados del mutante PGAsup. El derivado control, PGAcysB276, inmovilizado sólo a través de la cisteína presenta una estabilidad menor que los otros dos derivados. El derivado Eupergit- PGAcysB276 incubado a pH 10 tiene una vida media de 13 h mientras que el derivado control y el derivado Eupergit-PGApost tienen una vida media de 4 y 6 h respectivamente.

La estabilidad frente a disolventes se muestra en la **Figura 46**. El derivado PGAsup es ligeramente más estable que el control y que el derivado PGAcysB107 incubado a pH 10 pero las diferencias no son significativas. En el caso de los derivados del PGApóst no se observan diferencias entre ellos.



**Figura 46.** Curso de estabilidad frente a disolvente de los derivados de Eupergit-PGAsup (A) y Eupergit-PGApost (B). (■) Eupegit-PGAcysB107 (control); (■) Eupergit-PGAcysB107 inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (●) Eupergit-PGAsup inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (▲) Eupergit-PGAcysB276 (control); (▲) Eupergit-PGAcysB276 inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0; (◆) Eupergit-PGApost inmovilizado a pH 7.0 e incubado a pH 10.0. Condiciones: 60% dioxano (v/v) en 25mM de fosfato de sodio pH 7.0 a 4°C.

#### 4.2.2 Inmovilización covalente sobre soportes bifuncionales Eupergit-tiol.

Para asegurar que los distintos mutantes de PGA se están inmovilizando a través del grupo tiol de la cisteína y no a través de otro residuo, se realizó una nueva inmovilización en soportes bifuncionales de Eupergit que contenían grupos epóxido y grupos tiol reactivos en baja concentración (1  $\mu\text{mol}$  de grupos tiol reactivos/ g de soporte) (Grazú *et al.*, 2003). Como soporte control se bloquearon los grupos epóxido con glicina quedando el soporte con los grupos SH activos por donde la enzima se unirá a través de la cisteína (soporte monofuncional).

Enzima	Soporte	Inmovilización% tras 1h
PGA nativa	Eupergit-tiol reactivo	2
PGAcys B107	Eupergit-tiol reactivo monofuncional (control) <sup>a</sup>	62
PGAcys B107	Eupergit-tiol reactivo	45
PGAsup	Eupergit-tiol reactivo	50
PGAcys B278	Eupergit-tiol reactivo monofuncional (control)	52
PGAcys B278	Eupergit-tiol reactivo	51
PGApst	Eupergit-tiol reactivo	55

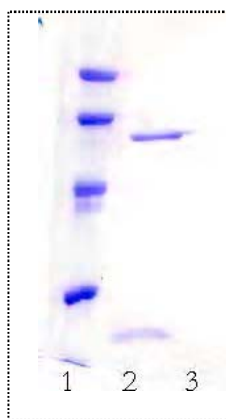
**Tabla 7.** Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre soporte bifuncional Eupergit-Tiol reactivos (activados con 2-PDS). <sup>a</sup>Grupos epóxidos bloqueados con glicina antes de la inmovilización. Actividad inicial: 10 UI/ml. Condiciones: pH 7.0 fosfato de sodio 25 mM a 25°C.

El primer paso para la inmovilización sobre estos soportes (*Introducción*, Fig.6) es la formación de un enlace reversible tiol-disulfuro entre la cisteína de los mutantes y el grupo sulfhidrilo del soporte. Esta etapa se realiza a pH 7.0 y permite alcanzar los rendimientos de inmovilización que se muestran en la **Tabla 7**. La inmovilización de la PGA nativa no es significativa.

Tras esta primera inmovilización se incubaron los derivados a pH 10 durante 48h a 25°C para permitir la reacción de los nucleófilos, principalmente lisinas, con los grupos epóxido dando lugar a uniones covalentes irreversibles. En el caso de los derivados control esto no sería posible ya que los grupos epóxido del soporte han sido bloqueados con glicina.

El puente disulfuro entre la enzima y el soporte es una unión reversible que en presencia de un agente reductor (DTT) es capaz de revertir el enlace. En cambio, la unión entre los grupos nucleófilos y los epóxidos del soporte permanecería inalterada en presencia del reductor por tratarse de una unión covalente irreversible.

Para comprobar qué tipo de unión estaba ocurriendo entre los mutantes y el soporte se realizó un análisis mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de mercaptoetanol y SDS). En la **Figura 47** se muestran los resultados obtenidos con los sobrenadantes tras hervir las muestras del derivado Eupergit-tiol del mutante PGAsup y el mutante que contiene sólo la cisteína PGAcysB107. En el segundo carril se puede apreciar que ambas subunidades de la PGA (24 kDa y 62 kDa) aparecen en el sobrenadante del derivado de PGAcysB107 inmovilizado sobre el soporte monofuncional (sólo tiol reactivos con epóxidos bloqueados). Esto significa que la unión a dicho soporte ocurre sólo a través de la cisteína en un enlace tiol-disulfuro reversible, por lo tanto se detectan ambas subunidades. En el carril 3, que corresponde al sobrenadante del derivado de PGAsup inmovilizado sobre Eupergit bifuncional, no se detecta ninguna de las dos subunidades. Esto indica que se ha logrado inmovilizar ambas subunidades de la enzima de forma irreversible al soporte a través de los residuos nucleófilos de la enzima y los grupos epóxidos del soporte. Este enlace covalente sería al menos a través de dos uniones enzima-soporte, uno por cada subunidad.



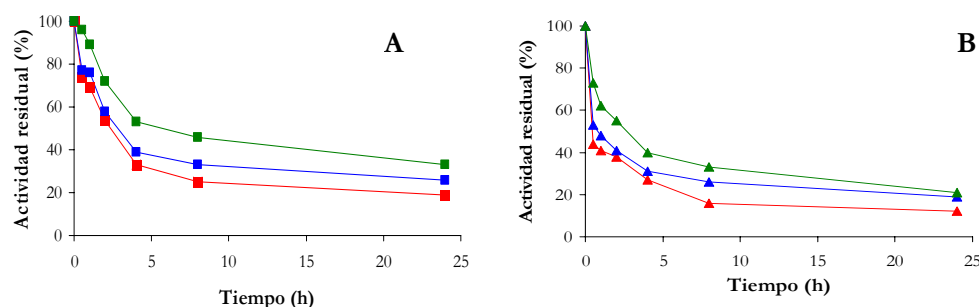
**Figura 47.**

Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante obtenido tras hervir los derivados de PGAsup sobre Eupergit-Tiol. Carril 1: marcadores peso molecular; carril 2: PGAcysB107 inmovilizado sobre Eupergit-Tiol monofuncional (derivado control); carril 3: PGAsup inmovilizado sobre Eupergit-Tiol bifuncional después de 48h a pH 10.0.

A la hora de estudiar la estabilidad térmica de estos nuevos derivados, no se observó ninguna mejora en cuanto a la estabilidad térmica entre el derivado unido por un solo punto, PGAcysB107 y el derivado Eupergit-tiol-PGAsup (datos no mostrados). En el caso del mutante PGApóst tampoco se logra una estabilización térmica en comparación con su derivado control inmovilizado sólo por la cysB276 (datos no mostrados).

Resultados similares se obtienen cuando se estudia la estabilidad del mutante PGApóst frente a codisolventes. La inactivación en presencia de dioxano 70% (v/v) (**Figura 48B**) muestra cómo las curvas de inactivación entre los derivados son similares, incluso el derivado bifuncional PGApóst presenta una mayor desestabilización que los otros dos. Por el contrario, el derivado de la PGA mutada en la zona superior (PGAsup) parece presentar una mayor estabilidad frente a codisolventes una vez unido a los soportes bifuncionales (4.4 veces) (**Figura 48A**).

Ambas zonas mutadas parecen no haber mejorado significativamente la estabilidad térmica tras la unión a soportes Eupergit bifuncionales. Parece no haberse logrado rigidificar la estructura a través de las zonas donde se han introducido los nuevos nucleófilos. La inmovilización a través de la zona superior sí permite mejorar ligeramente su estabilidad frente a disolventes.



**Figura 48.** Estabilidad en 70% (v/v) de dioxano de los derivados Eupergit-Tiol-PGAsup (A) y Eupergit-tiol-PGApóst (B). (■) Monofuncional-PGAcys107 (control); (■) Bifuncional-PGAcysB107; (■) Bifuncional-PGAsup. (▲) Monofuncional-PGAcysB276(control); (▲) Bifuncional-PGAcysB276; (▲) Derivado bifuncional-PGApóst. Condiciones: 4°C, 25mM fosfato pH 7.0.

#### 4.2.3 Inmovilización covalente sobre glioxil agarosa.

Los mejores factores de estabilización descritos hasta el momento se han logrado siempre sobre soportes tipo agarosa ya que estos presentan una mayor congruencia con la enzima a la hora de realizar la inmovilización (Grazú, 2006; Mateo *et al.*, 2006a).

La inmovilización sobre los soportes agarosa glioxil tiene lugar a través de los grupos ε-amino de las lisinas dando lugar a una unión covalente multipuntual que produce derivados más estables (Mateo *et al.*, 2006a). Los mutantes PGAsup y PGApóst están enriquecidos en nucleófilos, principalmente en lisinas. Aprovechando este incremento en grupos ε-amino se quiso estudiar si estas mutaciones tendrían algún efecto en la inmovilización sobre este soporte.

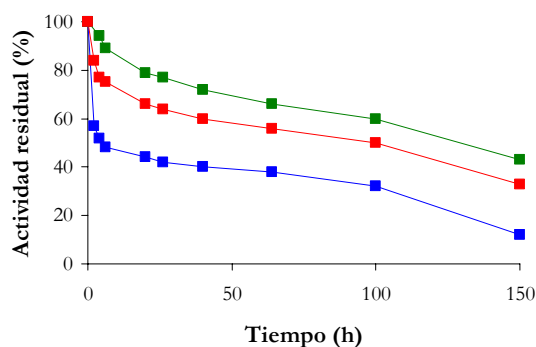


Enzima	Rdto. Inmovilización 24h (%)	Actividad expresada (%)
PGA nativa	100	87
PGAcysB107	100	72
PGAsup	100	81
PGAcysB276	100	85
PGApóst	100	94

**Tabla 8.** Actividad inmovilizada y expresada de los distintos derivados de PGA inmovilizada sobre agarosa glioxil 10BCL. Actividad inicial: 12 UI/ml.

La **Tabla 8** muestra los rendimientos de inmovilización y las actividades expresadas de cada uno de los mutantes y de la enzima nativa. Se logró una inmovilización del 100% de la enzima ofrecida al soporte y no se observaron diferencias en la cinética de inmovilización entre ellas (datos no mostrados). Esto quiere decir que el incremento en estas dos zonas no aumenta significativamente la velocidad de unión de la enzima al soporte. En este caso la cisteína no sirve como medio para dirigir la inmovilización. Ésta tendrá lugar por la zona que esté más enriquecida en lisinas ya que cuanto mayor sea su número antes se logrará una unión al soporte por al menos dos puntos para su inmovilización sobre glioxil (Alvaro *et al.*, 1990). Las zonas donde se han introducido las mutaciones carecen de lisinas por lo que no se han incrementado residuos en zonas que ya hubiera lisinas de forma natural.

Se estudiaron tanto la estabilidad térmica como la estabilidad frente a disolventes de ambos mutantes inmovilizados sobre agarosa glioxil. No se observa una mejora de la estabilidad térmica en caso de los dos mutantes comparados con el derivado agarosa glioxil de la PGA nativa. En el estudio de la estabilidad frente a disolventes se puede apreciar, al igual que ocurría en el soporte Eupergit bifuncional, una mejora en la estabilidad en el caso de los derivados del mutante PGAsup (**Figura 49**). En el caso del mutante PGApóst no se observan diferencias frente al glioxil de la enzima nativa (datos no mostrados).

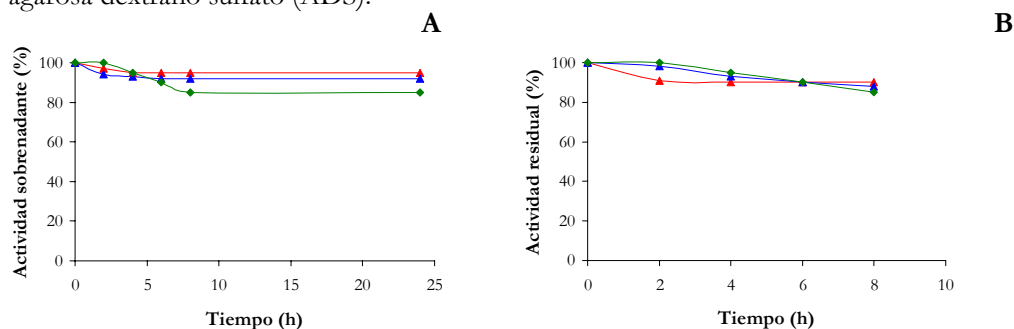


**Figura 49.**

Estabilidad en 70% (v/v) de dioxano de los derivados agarosa glioxil-PGAsup. (■) Agarosa glioxil-PGA nativa (control); (■) Agarosa glioxil-PGAcysB107; (■) Agarosa glioxil-PGAsup. Condiciones: 4°C en 25mM fosfato de sodio pH 7.0.

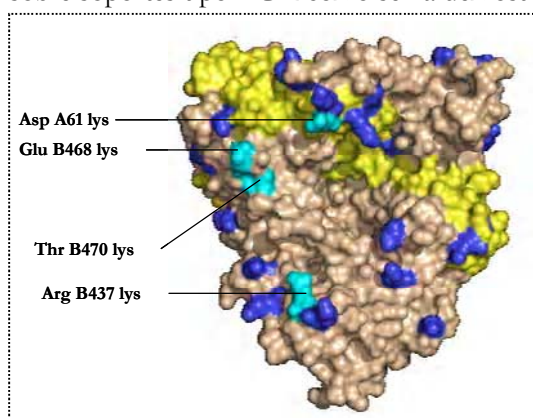
### 4.3 Inmovilización reversible sobre soportes aniónicos.

Se quiso evaluar también si el incremento en grupos amino (lisinas), mejoraba significativamente la adsorción sobre soportes catiónicos tipo agarosa carboximetil (ACM) y agarosa dextrano sulfato (ADS).



**Figura 50.** Curso de inmovilización sobre carboximetil agarosa ACM (A) y dextransulfato agarosa (ADS) (B) de PGA nativa y PGAsup y PGApóst. (♦) PGA nativa; (▲) PGAsup; (▲) PGApóst. Condiciones: tampón fosfato 5mM, pH 7.0 a 25°C. Actividad inicial 10UI/ml.

La **Figura 50** muestra la cinética de inmovilización sobre ambos soportes. Como podemos observar transcurridas 24 h no se ha logrado la inmovilización de ninguno de los mutantes, PGAsup o PGApóst, sobre ACM o ADS. Por lo tanto, el incremento de residuos cargados positivamente al pH de inmovilización (pH 7.0) no ha sido suficiente para lograr adsorber los mutantes PGAsup y PGApóst sobre intercambiadores convencionales tipo ACM o a soportes recubiertos con polímeros aniónicos (ADS). A la vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar para estudios posteriores de adsorción otro mutante, PGAB437, previamente obtenido en el laboratorio (Grazú, 2006). Este mutante (**Figura 51**) también posee cambios en su superficie que permiten su adsorción sobre soportes tipo ACM como se ha demostrado anteriormente (Grazú, 2006).

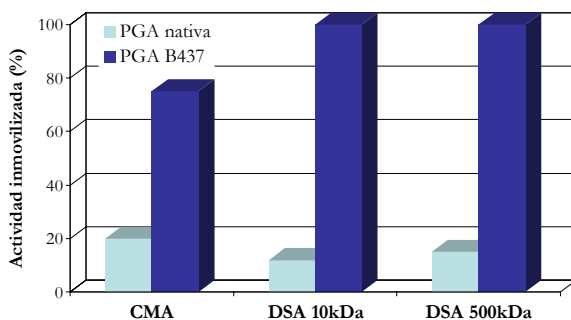


**Figura 51.** Representación tridimensional del mutante PGAB437 (Grazú, 2006). En amarillo la cadena A de la PGA. En azul oscuro las lisinas y en azul claro las 4 mutaciones introducidas.

Este mutante presenta un enriquecimiento en 4 lisinas en una zona próxima al centro activo donde la enzima nativa ya presenta un elevado número de dichos residuos.

#### 4.3.1 Inmovilización de PGAB437 sobre ACM y ADS.

En la **Figura 52** se muestran los rendimientos de inmovilización de la PGA nativa y de la PGAB437 sobre distintos intercambiadores catiónicos. Como se había observado previamente (Grazú, 2006), la PGA nativa no se adsorbe significativamente a este tipo de soportes a pH 7.0 (10-15% de la actividad inicial ofrecida al soporte). La introducción de las lisinas permite alcanzar rendimientos de inmovilización del 75% en caso de la inmovilización sobre ACM y del 100% en soportes poliméricos de agarosa recubierta de dextrano sulfato (ADS).



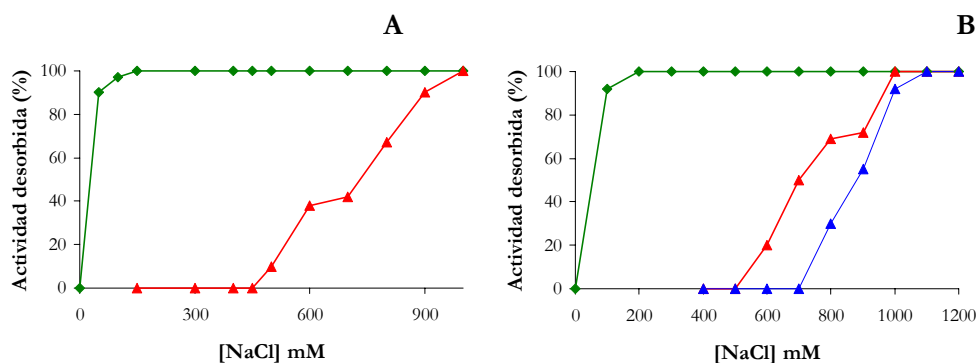
**Figura 52.**

Inmovilización de PGAB437 sobre intercambiadores catiónicos (ACM y ADS) a pH 7.0. (■) PGA nativa (■) PGAB437. Condiciones: fosfato de sodio 5mM pH 7.0 a 25°C. Actividad inicial de 10UI/ g de soporte.

#### 4.3.2 Estudio de la fuerza de unión de la PGAB437 al soporte.

Para determinar la fuerza de unión entre la enzima mutada PGAB437 y los soportes catiónicos se realizaron estudios de desorción de la proteína aumentando la fuerza iónica del medio incubando los derivados en presencia de NaCl. Las **Figuras 53A y B** muestran las curvas de desorción de la enzima nativa y mutada de ambos soportes. La enzima mutada se adsorbe fuertemente a ambos intercambiadores no logrando la desorción completa de la enzima hasta concentraciones de 1 M de NaCl en el caso de ACM y de 1.3 M de NaCl en el caso de los soportes ADS.

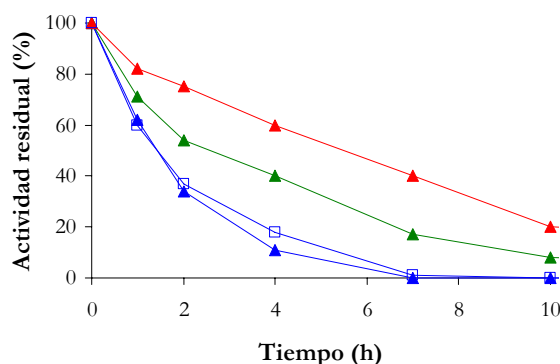
Comparando ambos soportes entre sí, se puede observar cómo la fuerza de unión al polímero dextrano sulfato de 500 kDa es superior a la fuerza de unión sobre ACM y ADS 10 kDa. Para desorber el 50% de la actividad ofrecida al soporte ACM es necesaria una concentración de 740 mM de NaCl mientras que para lograr desorber el mismo porcentaje del soporte ADS 500 kDa se necesita una concentración de NaCl de 900 mM.



**Figura 53.** Estudio de la fuerza de unión de la PGA nativa y PGAB437 adsorbidas sobre ACM (A) y ADS (B). A. (♦) PGA nativa; (▲) PGAB437. B. (♦) PGA nativa; (▲) PGAB437 desorbida de ADS 10kDa (▲) PGAB437 desorbida de ADS 500kDa. Condiciones de desorción: tampón fosfato 5mM, pH 7.0. Actividad inicial de 10 UI/ g soporte.

#### 4.3.3 Estabilidad frente a agentes desnaturalizantes.

Al estudiar la estabilidad de estos mismos derivados en presencia de codisolventes orgánicos, el mutante PGAB437 adsorbido sobre ACM presentó una estabilidad similar al derivado comercial de Fluka (**Figura 54**). De forma parecida a lo que ocurría con la enzima aminada químicamente, la enzima adsorbida sobre ADS presenta una estabilidad mayor en presencia de dioxano comparada con los anteriores. Cuanto mayor es el tamaño del polímero que recubre a la enzima inmovilizada mejores son los factores de estabilización logrados frente al disolvente. Se consiguió así un factor de estabilización de 4 si se compara el derivado comercial de Fluka con la PGAB437 adsorbida sobre agarosa DS 500 kDa.



**Figura 54.** Estabilidad en 60% (v/v) de dioxano de los derivados ACM-PGAB437 y ADS-PGA437 adsorbida sobre distintos intercambiadores catiónicos. (□) Derivado comercial FLUKA; (▲) ACM-PGAB437; (▲) ADS-10 kDa PGAB437; (▲) ADS-500 kDa-PGAB437. Condiciones: 25mM fosfato de sodio pH7.0, 4°C.

## DISCUSIÓN

---

La simplificación de los métodos de inmovilización junto con la necesidad de lograr derivados enzimáticos más estables son factores necesarios para la implantación con éxito de los biocatalizadores en la industria. Si se diseñan métodos más sencillos de inmovilización se logrará abaratar los costes del proceso tanto por los reactivos necesarios como por el empleo de personal cualificado en su preparación. A su vez, la estabilidad juega un papel importante, ya que determina la posibilidad económica de aplicar una enzima en un proceso industrial (Eijssink *et al.*, 2004; Ó'Fágáin, 2003). Una mayor estabilidad se considera generalmente una ventaja económica por el reducido número de recambio (*turnover*) que presentan las enzimas; además, permite el uso de enzimas en procesos con temperaturas elevadas, lo cual puede tener efectos beneficiosos en la velocidad de las reacciones, en la solubilidad de los reactivos y se reduce el riesgo de una contaminación microbiana (Martinek *et al.*, 1977).

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta un ejemplo de cómo el uso combinado de distintas técnicas de tecnología enzimática puede ofrecer nuevas y ventajosas soluciones a problemas en el diseño de biocatalizadores industriales.

## 1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE DE PGA DE *E. coli*.

Los métodos de modificación química han sido ampliamente utilizados como herramienta complementaria en los métodos de análisis y caracterización de proteínas. Por ejemplo, se han utilizado para identificar aquellos residuos involucrados en determinadas funciones o para mejorar las propiedades de las enzimas desde un punto de vista más aplicado (Hao *et al.*, 2006; Kawase *et al.*, 1991; Park, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

En este trabajo se ha pretendido, no mejorar en sí las propiedades intrínsecas de la PGA sino lograr nuevas estrategias de inmovilización modificando la enzima en los aminoácidos más expuestos al medio que son los que participan en el enlace con el soporte.

La modificación química de la superficie proteica es una técnica rápida que no precisa del conocimiento de la estructura de la enzima (Ó'Fágáin, 2003). Se lleva a cabo una vez que la enzima está plegada y por lo tanto, es posible realizar modificaciones más drásticas en la superficie de la proteína sin causar interferencias con el plegamiento de la misma. De hecho, se ha descubierto que incluso la modificación total de los grupos iónicos superficiales de la enzima por cargas opuestas tiene un efecto significativo positivo en la actividad enzimática (Khajeh *et al.*, 2001). Esta técnica se puede usar para realizar una

primera aproximación de una forma rápida como paso previo a la obtención de mutantes. La modificación genética de la enzima puede ser el objetivo final una vez haya sido demostrada la validez de la idea utilizando las enzimas químicamente modificadas. La obtención de los mutantes puede conllevar inicialmente más tiempo que la modificación química y las mutaciones introducidas no deben interferir con el correcto plegamiento de la proteína pero una vez obtenido el mutante puede emplearse sin ningún tratamiento adicional.

La modificación química y las modificaciones genéticas pueden ser complementarias, como muestra el aumento de estabilidad logrado en una fitasa modificada genéticamente seguida del entrecruzamiento de sus cadenas de polisacárido (Brugger *et al.*, 2001).

### **1.1 Succinilación de los grupos $\epsilon$ -amino de las lisinas.**

La modificación con anhídrido succínico de las lisinas expuestas de la PGA permitió incrementar el número de residuos ácidos en la proteína de 77 a 91-113 dependiendo del grado de modificación deseado. Como se ha visto en las Figuras 3 y 4 (*Resultados*), el efecto de la modificación sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica es negativo cuanto mayor es el grado de modificación. Esto puede deberse a la repulsión de cargas que está ocurriendo en la superficie de la enzima totalmente modificada con la consiguiente desestabilización de la estructura y pérdida de la actividad.

La succinilación de la superficie de la enzima PGA nos permite un diseño de protocolos de inmovilización y estabilización mucho más sencillos que los que se pueden obtener con la enzima sin modificar (Abián *et al.*, 2002)

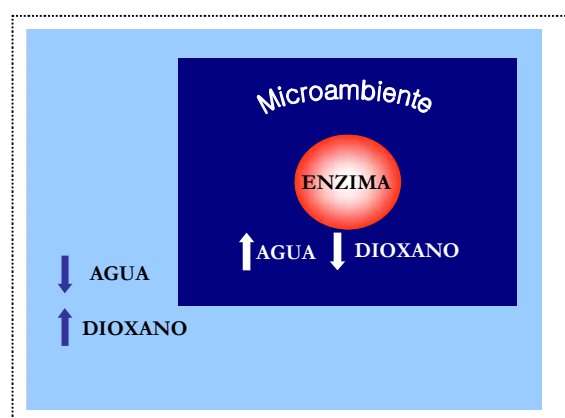
Mediante el incremento del número de grupos carboxilos en la superficie de la PGA, ésta se logra adsorber sobre soportes en los que previamente no era posible su inmovilización; como el soporte convencional DEAE agarosa empleado normalmente en cromatografía y el soporte agarosa-PEI (Mateo *et al.*, 2000b).

Todas las enzimas succiniladas (desde un 20% al 100% de succinilación de lisinas) se adsorben muy rápidamente, incluso a pH 7.0 y 4°C, a geles de agarosa recubiertos con polietilenimina con una retención total de su actividad catalítica. Esto sugiere que el sistema de inmovilización es muy suave con la estructura de la proteína, posiblemente debido al tipo de mecanismo involucrado en la adsorción iónica. Esto implica la

interacción de las zonas cargadas de la superficie permitiendo que el polímero se adapte a la estructura de la proteína sin que distorsione su estructura (Andersson y Hatti-Kaul, 1999; Bryjak, 1995; Mateo *et al.*, 2000b)

La enzima altamente succinilada se adsorbe muy fuertemente a los soportes agarosa-PEI. De hecho, no se empieza a desorber hasta que se utilizan concentraciones de NaCl superiores a 300 mM mientras que a esa concentración salina la enzima está ya completamente desorbida del soporte agarosa DEAE. También hay que destacar que cuanto mayor es el número de residuos amino modificados, la unión con el soporte se hace más intensa, necesitando una concentración de sal superior en la enzima succinilada en su totalidad. Dada la interesante estabilidad de la PGA nativa y la conservación de la misma tras el proceso de inmovilización reversible, estos derivados podrían utilizarse como catalizadores en la hidrólisis de sustratos incluso en condiciones de moderada fuerza iónica y una vez que la enzima se inactivase se recuperaría el soporte para posteriores inmovilizaciones (Tümtürk y Tufan, 2004).

La presencia de PEI adsorbida sobre la superficie de la PGA permitiría aumentar notablemente la estabilidad de los derivados frente al efecto de los codisolventes orgánicos. Probablemente el entorno hipersalino donde se ha adsorbido la enzima genere algún fenómeno de reparto del disolvente disminuyendo la concentración efectiva del mismo en el entorno de las moléculas de enzima inmovilizada (Fernández-Lafuente *et al.*, 1999b; Wilson *et al.*, 2004). La enzima succinilada totalmente presenta una vida media superior que la enzima succinilada parcialmente (Fig. 8B, *Resultados*) por lo que la enzima con más cargas negativas introducidas parece que está interaccionando más intensamente con el polímero, protegiéndola éste del efecto del codisolvente (**Figura 1**).



**Figura 1.** Disminución de concentración efectiva de disolvente en el entorno de la enzima.



El uso de codisolventes en el medio de reacción conduce, por lo general, a una rápida inactivación de las enzimas (Persichetti *et al.*, 1995), limitando su uso a nivel industrial (Gupta, 1991; Mozhaev *et al.*, 1990). La causa de esta inactivación son los cambios conformacionales inducidos en la estructura proteica por el codisolvente. La actividad de la enzima está relacionada con la cantidad de agua, el tamaño de la enzima y el microambiente del catalizador (Khalaf *et al.*, 1996). La interacción entre el codisolvente orgánico y el agua íntimamente asociada a la enzima controla la actividad de la enzima y la ruptura física del enlace entre el agua ligada y la enzima provoca su inactivación (fenómeno conocido como *water stripping*) (Zaks y Klibanov, 1988). Por lo tanto es importante mantener esa capa de agua en la superficie que rodea a la enzima para mantener su conformación catalíticamente activa (Klibanov, 1997).

Al recubrir el biocatalizador con microambientes de polímeros iónicos como la PEI, se protege a la enzima del efecto del disolvente disminuyendo su concentración entorno a la proteína, manteniendo así la capa de agua esencial para la actividad de la enzima (Abián *et al.*, 2002; Fernández-Lafuente *et al.*, 1996).

Hasta ahora se había conseguido rodear la PGA nativa de estos ambientes hidrofílicos recubriendo la enzima unida covalentemente a soportes agarosa glioxil con sucesivas capas de distintos polímeros iónicos (PEI-dextrano, aldehído-dextrano sulfato)(Abián *et al.*, 2002). Al tener la enzima succinilada no sería necesario preparar un derivado tan complejo para estabilizar la enzima ya que se habría logrado en un primer paso que la enzima interaccionara con la PEI, efecto que no se lograba en el caso de la enzima nativa y era necesario recubrir el derivado con un número elevado de capas de polímeros iónicos.

De este modo, estos derivados, tan sencillos de preparar sobre soportes reutilizables, podrían ser incluso excelentes catalizadores de procesos químicos de síntesis de antibióticos en presencia de concentraciones de disolventes orgánicos moderadamente altas.

Utilizando PGA parcialmente succinilada (20% de los residuos de lisina accesibles al medio están modificados) se pudo diseñar un nuevo método de inmovilización basado en la adsorción de la enzima sobre soportes agarosa PEI y posteriormente entrecruzar con glutaraldehído de residuos de lisina de la enzima y los residuos amino primarios de la PEI.

Estos nuevos derivados de PGA son muy fáciles de preparar, conservan un porcentaje muy elevado de la actividad catalítica y son mucho más estables que la enzima

soluble y que los derivados obtenidos por inmovilización reversible frente al efecto del calor. Parece que una cierta interacción multipuntual entre la enzima y los polímeros podría ser responsable de los interesantes aumentos de estabilidad (pe., frente al calor). También los derivados son mucho más estables frente a disolventes orgánicos, incluso más que los derivados obtenidos por simple adsorción sobre PEI-agarosa.

## **1.2 Aminación de los grupos carboxilo de aspárticos y glutámicos.**

El enriquecimiento en grupos amino primario de la superficie de la PGA permite el desarrollo de nuevos y mejores métodos de inmovilización que no se pueden desarrollar o se desarrollan peor con la enzima PGA sin modificar. En este segundo caso el efecto de esta modificación es superior que en la succinilación ya que es posible introducir hasta 77 nuevas cargas positivas frente a las 36 cargas negativas nuevas introducidas en la anterior modificación química.

Al igual que ocurría en la succinilación, se puede controlar el grado de modificación variando la concentración del activante de grupos carboxilo, carbodiimida, en el medio (Hoare y Koshland Jr, 1967). La enzima que contiene el 100% de sus grupos carboxilos modificados, PGA-amino-100, presenta una estabilidad y actividad inferior que la enzima parcialmente modificada, lo cual puede ser debido a la desestabilización producida por la gran cantidad de nuevas cargas superficiales. Al haber realizado una modificación tan agresiva se está anulando el efecto de atracción y repulsión de cargas opuestas que contribuyen a fijar una determinada conformación de la proteína nativa. Así, las enzimas que hayan sufrido la modificación química presentan diferentes cargas en su superficie con respecto a la enzima nativa. Dependiendo del grupo introducido se podrá dar bien el aumento o la disminución de la carga neta de la superficie de la enzima en función del pH del medio.

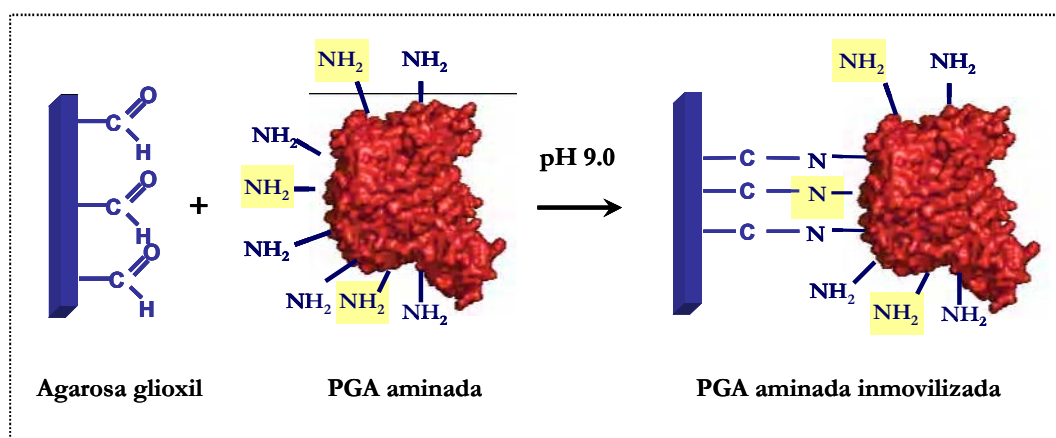
### **1.2.1 Derivados agarosa glioxil optimizados y más estables.**

La obtención de la enzima enriquecida en grupos aminos ha permitido optimizar su inmovilización multipuntual sobre soportes agarosa glioxil. En el estudio de la estabilidad térmica de dichos derivados se puede apreciar como la PGA aminada inmovilizada sobre glioxil agarosa presentó una vida media de alrededor de 5 veces mayor que la PGA no aminada e inmovilizada, lo cual significa unas 10000 veces más estable que

la enzima inmovilizada sobre un solo punto (Rosell *et al.*, 1995). Resultados similares de estabilización se obtuvieron al estudiar la estabilidad de los derivados incubados en el disolvente dimetilformamida, donde el derivado con la enzima parcialmente modificada presenta una vida media superior en comparación con la totalmente modificada. Esta mayor estabilidad puede deberse al aumento del número de enlaces covalentes con el soporte a través de los aminos introducidos (Fernández-Lafuente y Guisán, 1998). Se estaría así consiguiendo una mayor rigidificación de la estructura proteica haciéndola resistente a agentes inactivantes como el calor y disolventes.

En términos absolutos, la mejor estabilización se consigue con una aminación del 50% de los grupos carboxilo de la enzima ya que una aminación del 100% (mayor factor de estabilización) promueve una importantísima pérdida de estabilidad térmica de la enzima soluble modificada (Martinek *et al.*, 1977). Esta pérdida puede deberse a la desaparición del equilibrio de cargas en la superficie de la PGA que presenta todos los grupos carboxilos sustituidos.

La introducción de estos nuevos grupos amino en la proteína permitió realizar la inmovilización sobre los soportes agarosa glioxil en condiciones más suaves que con la enzima nativa debido a que el pKa del grupo amino de la etilendiamina es más bajo que el pKa del grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993). A pH 10, la enzima se inmovilizará por la región/es con una mayor densidad de lisinas además de por los grupos amino primario introducidos por modificación química. En cambio, a pH 9, la inmovilización tiene lugar a través del área con una mayor densidad de grupos amino primarios introducidos químicamente ya que a este pH menor las lisinas son incapaces de reaccionar con el soporte (**Figura 2**).



**Figura 2.** Mecanismo de inmovilización a distintos valores de pH de la enzima aminada con EDA.

La mayor estabilización se consigue cuando la enzima aminada en un 50% de sus grupos carboxilo se inmoviliza a pH 9.0 orientándose sobre el soporte a través de los nuevos grupos amino introducidos y posteriormente se incuba a pH 10.0 para optimizar la unión covalente multipuntual entre todos los residuos amino de esta región de la enzima y todos los grupos glioxil del soporte. Estos derivados conservan el 90% de la actividad después de incubarse a 66°C durante 100 horas mientras que los mejores derivados de la enzima sin modificar sólo conservan un 30 % de actividad después de una incubación en las mismas condiciones. El poder combinar ambos valores de pH permite establecer un mayor número de enlaces entre la enzima y el soporte y/o implica una región en la inmovilización más relevante en la inactivación de la enzima (Scouten, 1983).

### 1.2.2 Nuevos derivados de PGA adsorbidos sobre intercambiadores catiónicos.

La nueva enzima aminada obtenida se logra adsorber completamente a los geles agarosa dextrano sulfato (ADS) y agarosa carboximetil (ACM) mientras que sólo un 10-15% de la enzima se adsorbe en el caso de la enzima sin modificar (Tabla 2, *Resultados*). Nuevamente la modificación permite preparar derivados de una forma sencilla, mediante adsorción iónica sin necesidad de emplear complejos protocolos o reactivos peligrosos. También el soporte utilizado es fácil de preparar, incluso más sencillo que el soporte de agarosa recubierta con PEI ya que sólo es necesaria la interacción iónica entre el dextrano sulfato comercial y el soporte agarosa amino (Fuentes *et al.*, 2004a).

Los estudios de fuerza de unión de la proteína al soporte muestran que partiendo de una enzima nativa que apenas es capaz de adsorberse sobre los intercambiadores iónicos se logra obtener una enzima que no es posible desorber incluso en presencia de 1 M de NaCl con la simple aminación química de la enzima.

Las diferencias encontradas entre los soportes recubiertos por polímeros y los soportes iónicos convencionales concuerda con lo descrito en la bibliografía (Fuentes *et al.*, 2004a) En ambos casos puede observarse como la modificación total de los grupos tiene un efecto claramente mayor en la adsorción de la enzima totalmente modificada que en la modificada parcialmente. Aunque la modificación parcial de la enzima debería aumentar las posibilidades de una intensa adsorción multipuntual, la presencia de asp y glu no modificados (cerca de 40), que presentarían la misma carga que la carga del soporte, estarían promoviendo cierta repulsión, reduciendo la fuerza de adsorción. Sería posible revertir este efecto empleando en la inmovilización cationes polivalentes que revirtiesen

esta repulsión lográndose una fuerza de adsorción mayor (Fuentes *et al.*, 2006). Una vez que la enzima se inactive podría ser desorbida en presencia de 100 mM HCl/1 M NaCl o 9 M de guanidina etc, pudiendo recuperarse el soporte para posteriores usos.

La menor fuerza de adsorción de la enzima completamente succinilada en comparación con la enzima completamente aminada puede deberse al hecho de que los residuos de arginina permanecen inalterados en este tipo de modificación. Esto se traduce en un número global menor de cargas negativas que positivas obtenidas en la modificación con EDA (132 frente 113) y la presencia de un número significativo de grupos (Wong y Wong, 1992) con la misma carga que el soporte, que pueden promover cierta repulsión en la adsorción de la enzima (Fuentes *et al.*, 2006).

De nuevo parece que la película polimérica sobre la que se ha adsorbido la enzima disminuye (por fenómenos de reparto) la concentración de dioxano en las proximidades del centro activo de la enzima. Esto se traduce en una estabilidad mayor de la enzima (Fuentes *et al.*, 2004a) sin realmente rigidificar su estructura como muestra la poca estabilidad térmica alcanzada. Para confirmar esta hipótesis, se estudió el efecto inhibitorio del dioxano en la actividad de la enzima PGA-amino-50 inmovilizada sobre agarosa DS y la PGA nativa inmovilizada sobre BrCN (*Resultados*, Fig. 19). El primero sufre un efecto inhibitorio menor que la enzima unida covalentemente al soporte. Las diferencias entre el derivado de la enzima unida unipuntualmente mediante el enlace covalente y la adsorción iónica fueron más acusadas cuanto mayor era la concentración de disolvente en el medio. Cuando la concentración de disolvente era del 60%, el derivado con la enzima unida covalentemente estaba completamente inactivado mientras que el derivado con la enzima inmovilizada en ADS mantenía el 20% de su actividad. Según estos experimentos de inhibición por codisolventes podríamos considerar que la concentración de codisolvente en el entorno del centro activo de la enzima es un 30-40% menor que la concentración en la solución. Esto implica una mayor estabilidad y unos menores efectos inhibitorios (Fuentes *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2004).

## 2. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LA SUPERFICIE DE LA PGA EN EL DISEÑO DE NUEVOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS.

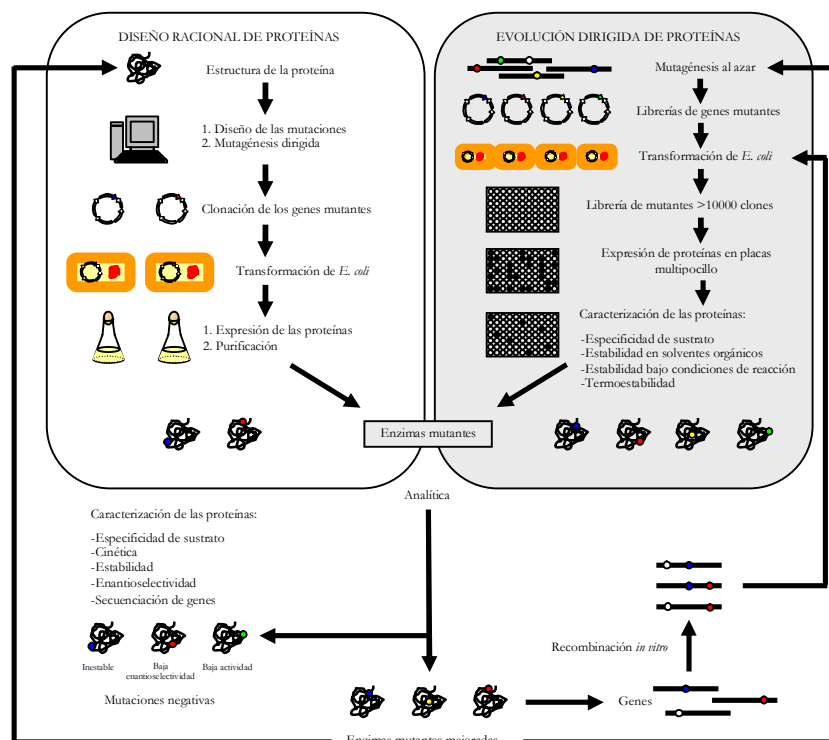
La capacidad de sustituir determinados aminoácidos y expresar grandes cantidades de enzima mediante técnicas de DNA recombinante permiten probar distintas hipótesis sobre la catálisis enzimática derivadas del conocimiento de su estructura, mecanismo catalítico o de estudios de modificación química (Plapp, 1995). La mutagénesis dirigida ha sido tradicionalmente empleada para identificar residuos en el centro activo que sean esenciales o críticos para la catálisis o que interaccionan directamente con el sustrato; mutando residuos del centro activo o próximos a él permite el estudio de cómo están involucrados en el mecanismo de acción (Ferreira *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha utilizado también la mutagénesis dirigida en residuos de la superficie proteica con el fin de lograr una enzima con una mayor estabilidad (Turunen, 2002). Cambios de residuos de gly por ala, cualquier aminoácido por pro, introducción de puentes disulfuro, introducción de puentes salinos o la introducción de residuos aromáticos en agrupamientos (*clusters*) permiten estabilizar la estructura tridimensional frente distintos agentes distorsionantes (Clarke y Fersht, 1993; Mansfeld *et al.*, 1997; Matsumura *et al.*, 1989; Matthews *et al.*, 1987). Contrario a lo que se pensaba anteriormente, se ha descrito recientemente que el papel del componente electrostático de la superficie proteica es cada vez más importante para la estabilidad (Eijsink *et al.*, 1995; Hoseki *et al.*, 1999; Machius *et al.*, 2003; Perl y Schmid, 2001). Grandes redes de interacción electrostática y un mayor estado de oligomerización son presuntamente favorables para mejorar la estabilidad (Maeda *et al.*, 2002; Walden *et al.*, 2001) y muchas de las diferencias en estabilidad en algunos casos se deben tan sólo a unas pocas mutaciones puntuales (Hasawaga *et al.*, 1999; Sandgren *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1999).

En este trabajo las mutaciones se han llevado a cabo en la superficie de la PGA pero no con el fin de mejorar la estabilidad de la proteína *per se* sino para permitir el desarrollo de nuevos derivados enzimáticos como continuación de los resultados obtenidos mediante la modificación química. Se han modificado genéticamente cargas en la superficie como se ha conseguido con la succinilación o la aminación pero sin alterar las propiedades catalíticas ni de estabilidad de la enzima nativa.

Para realizar los mutantes se escogió una estrategia de *diseño racional de la proteína* frente a una *estrategia de evolución dirigida* (Cherry y Fidantsef, 2003; Chirumamilla *et al.*, 2001; Frances H. Arnold, 2001)(Figura 3) ya que se ha necesitado previamente hacer un estudio de la estructura tridimensional de la PGA para saber dónde y cuáles residuos se quieren

mutar ya que serán los responsables de interaccionar con el soporte (Bornscheuer y Pohl, 2001).



**Figura 3.** Comparación entre el diseño racional y la evolución dirigida de proteínas. Adaptado de Bornscheuer y Pohl (2001).

Es esencial el estudio de la estructura tridimensional de la proteína para determinar qué residuos mutar. Para minimizar los cambios estructurales producidos por la mutagénesis se realizan sustituciones isoestéricas como muestra la **Tabla 1**. Sin embargo, estos cambios pueden alterar el patrón de las interacciones tipo puente de hidrógeno que pueden ser esenciales para mantener la estructura de la proteína así que será necesario evaluar la/s mutación/es en cada caso. No se puede generalizar el efecto de un cierto tipo de mutación en la estabilidad por lo tanto el efecto de cada mutación puntual debería ser siempre visto en el contexto de la estructura de la proteína (Bogin *et al.*, 1998; Mathatadze *et al.*, 2003; Strop y Mayo, 2000; Tollinger *et al.*, 2003).

**Tabla 1.** Mutaciones puntuales aceptadas frecuentes \*

<b>Cys</b>	→	Ser	<b>Ser</b>	→	Ala, Thr, Asn, Gly, Pro
<b>Thr</b>	→	Ser, Ala, Val	<b>Pro</b>	→	Ala, Ser
<b>Ala</b>	→	Ser, Gly, Thr, Pro	<b>Gly</b>	→	Ala, Ser
<b>Asn</b>	→	Asp, Ser, His, Lys, Gln, Glu	<b>Asp</b>	→	Glu, Asn, Gln, His, Gly
<b>Glu</b>	→	Asp, Gln, Asn, His	<b>Gln</b>	→	Glu, His, Trp, Gln
<b>His</b>	→	Asn, Gln, Asp, Glu, Arg	<b>Arg</b>	→	Lys, His, Trp, Gln
<b>Lys</b>	→	Arg, Gln, Asn	<b>Met</b>	→	Leu, Ile, Val
<b>Ile</b>	→	Val, Leu, Met	<b>Leu</b>	→	Met, Ile, Val, Phe
<b>Val</b>	→	Ile, Leu, Met	<b>Phe</b>	→	Tyr, Leu, Ile
<b>Tyr</b>	→	Phe, His, Trp	<b>Trp</b>	→	Phe, Tyr

\*Adaptado de Dayhoff *et al.* (1995).

## 2.1 Incremento en 8 glutámicos en la superficie de la PGA (PGA8glu).

La introducción de 8 glutámicos distribuidos por toda la superficie de la proteína ha permitido preparar derivados análogos a los que se obtuvieron con la modificación química mediante anhídrido succínico. En este caso no estamos modificando un número tan elevado de residuos como ocurría con la succinilación pero tampoco se está disminuyendo el número de lisinas de la superficie proteica ya que los residuos mutados, glutaminas o asparraginas, no presentan carga neta en sus cadenas laterales. Se estaría así evitando distorsionar las interacciones tipo puentes de hidrógeno o salinos establecidos por las lisinas.

Para situar cada mutación se dividió la proteína en 8 octantes introduciendo una mutación por cada octante en residuos suficientemente expuestos al medio que permitiesen la interacción con el soporte y no tuviesen efecto ni en la actividad ni en la estabilidad de la enzima. Previo a la obtención de los mutantes reales en el laboratorio se realizó un detallado análisis *in silico* de la estructura de la proteína. Tras mutar la proteína virtualmente y observar que se mantenía la estructura se introdujeron las 8 mutaciones mediante PCR como se ha descrito en *Material y Métodos*, 10.5.2. Estos 8 nuevos glutámicos no produjeron efecto alguno en la expresión y plegamiento de la proteína así como en las propiedades de la enzima en cuanto a perfil actividad pH y actividad-temperatura óptima se refiere. Se observó como el mutante era ligeramente más activo a pHs más ácidos.



Lo que sí se ve alterado es el punto isoeléctrico del mutante PGA8glu. La disminución del punto isoeléctrico viene determinada por el cambio de carga global realizado en la superficie de la PGA al incrementar las cargas totales negativas de 79 a 87 y su distribución en la superficie (*Resultados* Fig. 23).

Recientemente se ha demostrado que el remodelado de la superficie enzimática por mutagénesis dirigida permite el diseño de nuevos biocatalizadores dirigir su inmovilización sobre soportes a diseñados a medida mejorar su inmovilización en soportes a medida como una herramienta potente en la obtención de biocatalizadores industriales a medida (Abián *et al.*, 2004a; Grazú, 2006).

### **2.1.1 Nuevos derivados de PGA8glu adsorbidos sobre intercambiadores aniónicos.**

El aumento de 8 residuos glutámicos en la superficie de la PGA mediante mutagénesis ha permitido inmovilizar la enzima sobre intercambiadores aniónicos tipo agarosa DEAE y agarosa PEI, un proceso que no sería posible con la enzima nativa. Se logró alterar la capacidad de adsorción de la enzima sobre estos soportes. Dicha adsorción se llevó a cabo por un proceso multipuntual que sólo se pudo lograr a través del intercambio iónico producido entre varios residuos de la proteína y la superficie del soporte.

Al estudiar la fuerza de adsorción sobre los dos soportes se observa que no se ha logrado una unión tan fuerte si se compara con la enzima succinilada químicamente. Con una concentración de NaCl de 400 mM ya es posible desorber completamente el mutante del soporte agarosa PEI y con 350 mM de NaCl del soporte DEAE agarosa.

Hay que tener en cuenta que el número de cargas introducidas genéticamente es más reducido que de cuando se realiza de forma química por tanto no se espera lograr una adsorción tan intensa; a pesar de esto se intentó mejorarla mediante distintas estrategias. La primera de ellas fue el utilizar PEI de diferentes tamaños. Comercialmente hay disponibles PEIs que van desde 25kDa hasta 1000 kDa. Al incrementar el tamaño del polímero se está también aumentando el número de cargas positivas disponibles para una mayor interacción con los grupos carboxilo de la enzima. Pero como muestra la Figura 32 (*Resultados*), esto tampoco incrementó la fuerza de adsorción al soporte.

La moderada estabilización de la PGA inmovilizada sobre soportes de agarosa recubierta con PEI en presencia de codisolventes orgánicos junto con la ausencia de diferencias entre la enzima adsorbida sobre los dos soportes recubiertos con PEI de

distintos tamaños, sugirió que la enzima no estaba penetrando en la cama polimérica, y que tan sólo estaba interaccionando con la capa superficial de los grupos iónicos del soporte. Esta posibilidad se refuerza por el hecho de que la enzima puede ser total y rápidamente adsorbida en soportes convencionales cubiertos con grupos catiónicos bajo estas condiciones.

Una segunda estrategia se ideó entonces para lograr una mejora en la adsorción y en la estabilidad frente codisolventes orgánicos. El empleo de una alta fuerza iónica durante el proceso de inmovilización de la enzima que permite incrementar la fuerza de adsorción ha sido previamente descrito (Pessela *et al.*, 2005), sugiriendo que estas condiciones más restrictivas dificultan la adsorción multipuntual necesaria para fijar la proteína al intercambiador iónico, permitiendo que la enzima penetre mejor en la cama polimérica (Kumar *et al.*, 2000).

Así, para mejorar las propiedades de la PGA inmovilizada sobre soportes recubiertos con PEI, las condiciones de adsorción se llevaron hacia, condiciones aparentemente más astringentes, gracias a las nuevas propiedades que presenta el mutante PGA8glu y a la utilización de un intercambiador fuerte como es la PEI. Por lo tanto, se estudió la adsorción de la enzima en condiciones de bajo pH y en presencia de una mayor fuerza iónica en el medio.

La inmovilización de la enzima bajo condiciones más favorables (pH 7 y fuerza iónica baja) conlleva a que la adsorción sea sólo por la interacción de la enzima con los grupos externos del polímero, impidiendo la posibilidad de que la enzima pueda ser recubierta por éste. Esto puede explicar la falta de efecto del tamaño del polímero recubriendo el soporte en la estabilidad de la enzima y en la fuerza de adsorción cuando la enzima se inmoviliza a pH 7.0 y a baja fuerza iónica, condiciones en las que el mutante consigue inmovilizarse rápidamente incluso en soportes tipo DEAE.

En condiciones desfavorables, a pH 5, donde la enzima presentará un menor número de grupos carboxilos ionizados ya que el pH está próximo al pKa de estos, la adsorción del mutante se redujo sobre el soporte DEAE (menos de un 40% de la enzima del medio) y el uso de una fuerza iónica mayor redujo aún más el porcentaje de enzima adsorbida sobre los soportes. Bajo estas condiciones es necesario emplear hasta 400 mM de NaCl para desorber el 50% de la actividad inmovilizada del soporte. Una vez más se logra la protección frente a la desnaturalización frente al dioxano. Por lo tanto bajo estas condiciones la enzima estaría penetrando más en el polímero de PEI.

En condiciones más restrictivas se requiere la interacción del polímero con una superficie proteica mayor e involucra un mayor número de grupos del soporte. De esta forma, la enzima puede estar más recubierta por el polímero, aumentando así la protección frente a codisolventes (Abián *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2004).

El hecho de que los 8 glutámicos se distribuyesen homogéneamente a lo largo de toda la superficie proteica ha contribuido a recubrir la PGA con el polímero. Así, en el mejor derivado enzimático, la actividad de la proteína permanece inalterada tras la inmovilización, y puede ser usada a una fuerza iónica relativamente fuerte, bajo un amplio rango de valores de pH y presenta una estabilización significativa frente el efecto deletéreo de los disolventes orgánicos. A pesar de este incremento en la fuerza de adsorción, la PGA puede ser desorbida cuando se inactiva en el transcurso de la reacción al incubar el biocatalizador bajo distintas condiciones (100mM HCl), permitiendo la reutilización del soporte.

### 2.1.2 Nuevos derivados de PGA8glu por coinmovilización con PEI.

Aunque la PGA presenta una moderada termoestabilidad que ha permitido su rápida implementación en reacciones hidrolíticas, su rápida inactivación por los codisolventes orgánicos más comunes o medios anhidro (Arroyo *et al.*, 2002; Kim y Lee, 1996; LinADSy *et al.*, 2004; Svedas *et al.*, 1997; Svedas *et al.*, 1977) condiciona su presencia en reacciones de síntesis de antibióticos donde es necesario desplazar el equilibrio termodinámico en la dirección de síntesis o aumentar la solubilidad de compuestos hidrofóbicos (De Martin *et al.*, 1999; Fernández-Lafuente *et al.*, 1991; Fuentes *et al.*, 2004a; Illanes y Fajardo, 2001; Rosell *et al.*, 1995; Schroen *et al.*, 1999; Waldmann *et al.*, 1996).

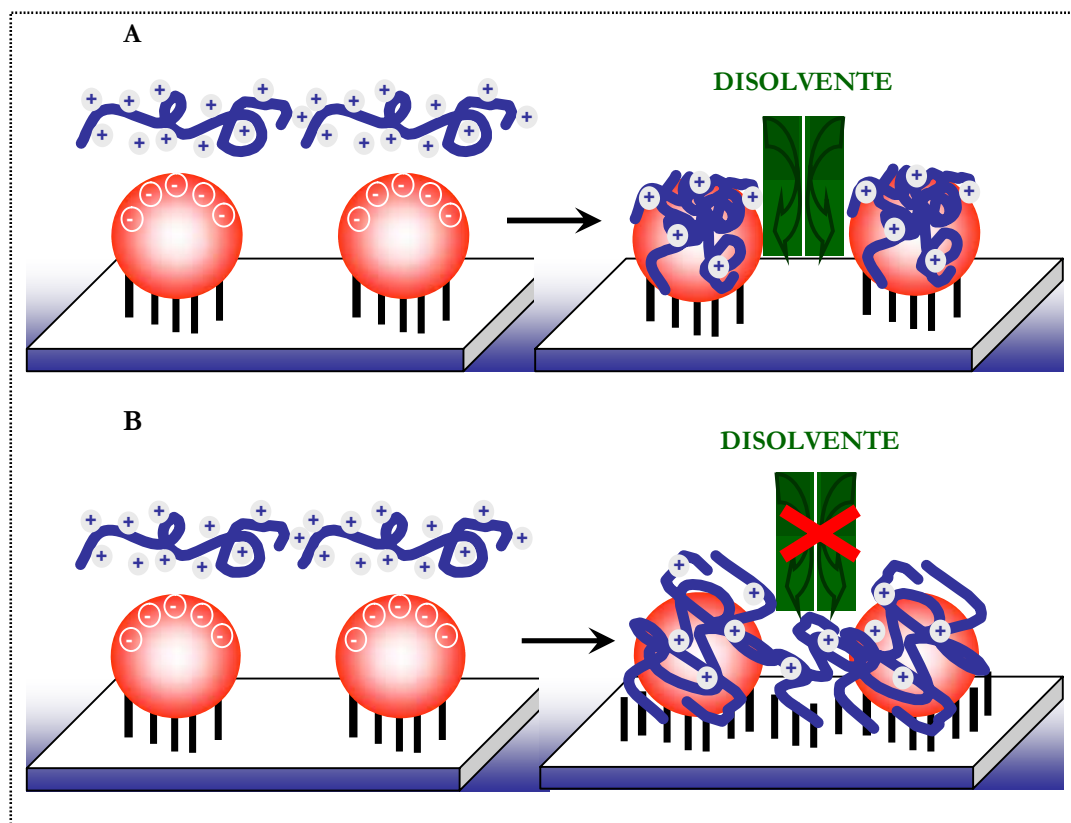
Dado el elevado interés en lograr derivados enzimáticos altamente estabilizados frente a codisolventes orgánicos, se combinaron métodos de inmovilización covalente multipuntual junto con la adsorción iónica sobre el polímero de PEI, factible gracias al nuevo mutante PGA8glu.

En un primer lugar se decidió inmovilizar primero la enzima sobre el soporte agarosa glioxil (*Introducción*, Fig. 4). La inmovilización se basa en la reacción de los grupos amino primarios de la enzima con los aldehídos del soporte. Una vez la enzima se inmovilice se reducirán los enlaces entre la enzima y el soporte así como los grupos aldehído libres del soporte, haciéndolos no reactivos (Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2005). Las

modificaciones de asn o gln en la superficie proteica no reducirán las posibilidades de reacción de la PGA sobre glioxil agarosa (*Resultados* Fig. 31).

Una vez inmovilizado el mutante sobre el soporte agarosa glioxil se añadió la PEI en solución y se dejó interaccionar con el derivado, permitiendo que el polímero recubriese la enzima. Se detectó cómo la PEI era capaz de recubrir la enzima mutada y no la nativa pero sólo se logró una ligera estabilización frente a los disolventes. Probablemente el polímero no es capaz de proteger en su totalidad la superficie de la enzima y el codisolvente acceda a la proteína en las proximidades del soporte (**Figura 4A**).

Para solucionar este problema e intentar crear una capa que recubriese totalmente a la proteína se ideó coinmovilizar la enzima con la PEI y el soporte, es decir, en este caso en lugar de reducir el enlace secundario entre la enzima y el soporte se añadía la PEI para que se adsorbiese sobre la enzima y a su vez reaccionase con el soporte. Ahora al reducir con borohidruro además de reducir los enlaces enzima-soporte se estarían reduciendo los enlaces de la PEI con el soporte glioxil (**Figura 4B**).



**Figura 4.** PEI adsorbida (A) o coinmovilizada (B) sobre el derivado agarosa glioxil PGA8glu.

Esta estrategia permite sacar ventaja de la estabilización de la enzima por unión covalente multipuntual (Mateo *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2006b) y la generación de un ambiente hiperhidrofílico entorno a la enzima (Abián *et al.*, 2002). La suma de ambos efectos permite una estabilización mayor en presencia de codisolventes orgánicos que la lograda tan sólo adsorbiendo la enzima sobre soportes recubiertos de PEI, donde la enzima está sólo protegida por el polímero (*Resultados*, Fig. 34). Se obtiene así un derivado 36 veces más estable que la enzima soluble.

Dependiendo del fin del biocatalizador, una ligera estabilización frente a codisolventes orgánicos se puede lograr utilizando la simple estrategia de adsorber la proteína sobre la matriz permitiendo la reutilización del soporte tras la inactivación de la enzima. Sin embargo, si se necesita una mayor estabilización, se puede combinar la unión covalente multipuntual junto con la generación de un microambiente artificial. Para hacer frente a la baja estabilidad de la PGA frente a disolventes orgánicos se necesita que el polímero recubra totalmente la superficie proteica para lograr una protección significativa. Con la coinmovilización de la enzima con la PEI de mayor tamaño se obtuvieron los mejores resultados. Estos derivados pueden ser usados en reacciones donde la estabilidad en disolventes orgánicos es un parámetro limitante (Arroyo *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2004).

## 2.2 Aumento de grupos nucleófilos en la superficie de la PGA.

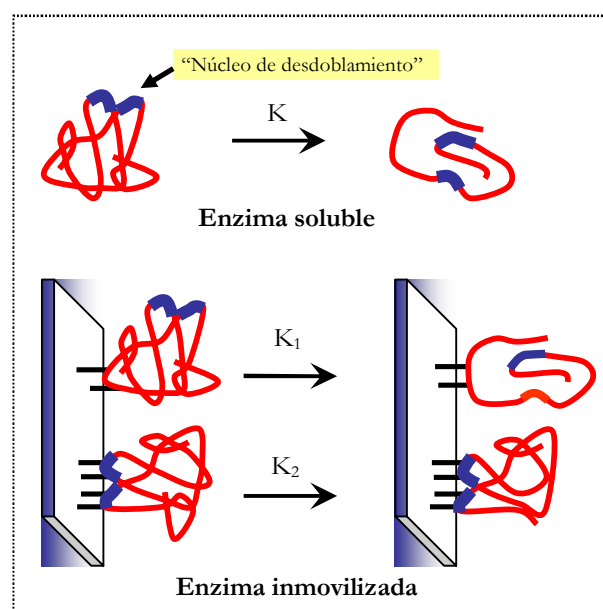
La inmovilización de una proteína no siempre conlleva su estabilización. Muestra de ello se observa en la bibliografía, donde se ha descrito que la inmovilización no tiene efecto alguno o incluso tiene efectos negativos en la estabilidad de algunas enzimas (Desmukth *et al.*, 1993; Gianfreda y Scarfi, 1991; Klibanov, 1983c; Nanalov *et al.*, 1993).

La desnaturalización térmica irreversible de una proteína normalmente comprende un paso de desplegamiento seguido por un proceso irreversible (agregación o en algunos casos proteólisis). Estudios en procesos de agregación y proteólisis sugieren que los pasos de despliegue de la proteína normalmente tienen un carácter parcial/local en contraposición a una desnaturalización global (Chiti *et al.*, 2002; Doyle *et al.*, 2003; Finke *et al.*, 2000; Thirumilai *et al.*, 2003).

Machius *et al.* (2003) utilizan el término “núcleo de desdoblamiento” para denominar “puntos débiles” en la proteína cuyo desplegamiento desencadena la inactivación térmica. Destacan recientemente que no se debería mirar “el desplegamiento

parcial” como una pérdida masiva de la estructura, sino más bien como la desestabilización/flexibilización, que puede depender de la cooperatividad en zonas más grandes de la proteína. Bibliografía reciente (Eijsink *et al.*, 2004) demuestra la viabilidad para mejorar la estabilidad de las proteínas mediante el diseño racional, pero puede ser difícil señalar en qué región de la proteína se debería centrar la modificación, y qué estrategia de mutación emplear. Se ha demostrado (Machius *et al.*, 2003) que en estos procesos de desplegamientos parciales están involucradas zonas localizadas de la superficie de la proteína, explicando porqué la superficie de las proteínas se ha descrito como una zona importante para la estabilización de proteínas.

Se ha propuesto que la zona por la que se une la enzima al soporte puede ser decisiva para el éxito de la estabilización por inmovilización (Mansfeld y Ulbrich, 2000; Schellenberg y Ulbrich, 1989; Ulbrich *et al.*, 1999) (**Figura 5**). Estos autores han planteado el efecto estabilizador de la inmovilización cuando estos “núcleos de desdoblamiento” se fijan al soporte. Actualmente son varias las proteínas de las cuales se han localizado estos núcleos de desdoblamiento: tropomiosina (Ishii, 1994) ribonucleasa A y B (Arnold *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 1998). Se ha descrito que se logra una mayor estabilidad térmica en aquellas proteínas que se han unido al soporte a través de la zona donde se ha propuesto que se inicia el proceso de desdoblamiento proteico bajo condiciones desnaturalizantes (Mansfeld y Ulbrich, 2000).



**Figura 5.** Núcleos de desdoblamiento de la proteína. El desplegamiento de la proteína comienza por la zona más lábil de la misma; si se fijan estas zonas se logrará la estabilización.

### 2.2.1 Mutantes PGAsup y PGApst en el diseño de nuevas zonas para la inmovilización covalente multipuntual.

La idea propuesta en esta parte del trabajo ha sido intentar dirigir la inmovilización de la PGA por zonas de la superficie que previamente no hayan sido exploradas por los distintos métodos de inmovilización. Esto permite localizar zonas sensibles a la desnaturalización, núcleos de desplegamiento, e intentar incrementar el número de enlaces al soporte en dicha zona para rigidificar la estructura proteica y evitar así su desestabilización.

El tipo de inmovilización que se empleó en este estudio fue la unión covalente multipuntual a soportes epóxido (Fig. 6, *Introducción*) donde los residuos nucleofílicos reaccionan con los grupos epóxido del soporte. Para dirigir la inmovilización se introdujo una cisteína en la superficie de la PGA (la enzima no contiene ningún residuo de cisteína en su estructura (Hunt *et al.*, 1990)) y a su vez se enriqueció la zona entorno a la cisteína con residuos nucleofílicos (lys, tyr) capaces de generar una unión covalente multipuntual.

Del estudio tridimensional de la proteína se seleccionaron dos zonas que presentaban las características buscadas; zonas por las que la inmovilización sobre soportes epóxido no transcurriría naturalmente por carecer de los residuos necesarios para ello, presentasen una ser/thr para ser mutada a cys, nucleófilos potenciales como son la arg y phe que se mutasen a lys y tyr (**Tabla 1**) manteniendo la estructura sin alterar. Los mutantes se denominaron PGAsup y PGApst en referencia a la situación de las zonas respecto al centro activo.

El mutante PGAsup contiene 6 nuevas mutaciones: 1 cys, 4 lys y 1 tyr mientras que la zona posterior, PGApst se diseñaron 7 mutaciones: 1 cys y 6 lys. Al igual que en el diseño del mutante PGA8glu se quiso que las mutaciones estuviesen lo más expuestas al medio posible para poder reaccionar con los grupos del soporte y que estos residuos no estuviesen involucrados en interacciones con otros residuos por puentes salinos o puentes de hidrógeno.

El estudio por dinámica molecular demostró que el reemplazamiento virtual no generó alteraciones en la estructura tridimensional de la enzima después de aplicar el protocolo de simulación por enfriamiento lento (Brünger *et al.*, 1990). Pero al obtener los mutantes en el laboratorio no fue posible introducir las 7 mutaciones en el mutante PGApst. La mutación en la arg B287 afectaba a la producción de la enzima en *E. coli* por lo que se decidió seguir la investigación con una mutación menos. Esta mutación que

afecta a la estructura pudo no ser detectada por dinámica molecular debido al complejo mecanismo de procesamiento que presenta la PGA (Fig. 13, *Introducción*) (Ignatova *et al.*, 2000; Kasche *et al.*, 1999) que no es modelado en la simulación.

La producción de los distintos mutantes fue similar a la expresión de la enzima nativa así como los perfiles de las curvas actividad-pH y actividad-temperatura, tan sólo la actividad específica del mutante PGAsup disminuyó significativamente con respecto a la enzima nativa. Por lo que alguna de las mutaciones causó esta disminución. A diferencia del mutante con el incremento en glutámicos, el valor de punto isoelectrico no presentó variación en el caso de PGAsup ni de PGApóst.

### 2.2.2 Derivados de PGAsup y PGApóst sobre soportes Eupergit y Eupergit-tiol.

La introducción de una cisteína en la superficie de la proteína permitió, por un lado orientar la inmovilización por esa zona y por otro, lograr una primera unión covalente a pH neutro sin necesidad de alta fuerza iónica gracias a la cisteína introducida. Ésta será capaz de reaccionar fácilmente con los epóxidos del soporte (Grazú, 2006) en comparación con el método convencional de inmovilización sobre Eupergit. El protocolo convencional para la inmovilización de PGA sobre soportes epóxido se realiza a pH neutro y a muy alta fuerza iónica (Mateo *et al.*, 2000a). Tras una primera adsorción hidrofóbica tiene lugar la unión covalente con el soporte pero, debido a la baja reactividad de los nucleófilos de la enzima a dicho pH (principalmente las lisinas), no se promueve una unión multipuntual muy intensa.

Los grupos epóxidos del soporte son capaces de reaccionar con varios nucleófilos de la superficie enzimática. Además de con los grupos tiol de las cisteínas también reaccionan con los grupos amino de las lisinas o los grupos hidroxilos de las tirosinas (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000; Wheatly y Schmidt, 1993) por eso los residuos seleccionados se mutaron a estos nucleófilos.

La cinética de inmovilización sobre los soportes Eupergit fue lenta pues si bien los grupos tiol son los nucleófilos con mayor reactividad a pH neutro hacia los grupos epóxido, su reactividad es baja comparada con la que presentan a pH más alcalinos.

Utilizando un pH neutro y disminuyendo la relación g de soporte/volumen de enzima, fue posible inmovilizar las tiol-enzimas de forma orientada a través de los grupos tiol a soportes Eupergit C, con la desventaja de que la cinética de unión fue lenta (24 h) y los rendimientos de unión bajos (Tabla 7, *Resultados*).



Los estudios de estabilidad muestran que no parece que sean zonas importantes para la estabilidad de la proteína ya que ni en la inactivación térmica ni en la inactivación frente a codisolventes orgánicos presentan diferencias significativas.

Los derivados obtenidos con el mutante que contiene sólo la cisteína y sin bloquear el soporte pueden estar estableciendo distintos enlaces a través de lisinas naturales de la enzima. Para confirmación de que la inmovilización estaba transcurriendo por la cisteína introducida lo ideal sería tener un soporte donde la primera inmovilización ocurriese a través de un intercambio tiol disulfuro específico para la unión del tiol de la cisteína. Para ello se sustituyeron un bajo número de grupos epóxidos del soporte con grupos SH; el soporte se denominó bifuncional Eupergit-tiol (Grazú *et al.*, 2003). Se intentó introducir la menor cantidad posible de grupos SH para evitar la eliminación de muchos grupos epóxidos necesarios para establecer las uniones multipuntuales.

Como muestra la **Tabla 8** (Resultados), los rendimientos de inmovilización sobre este soporte bifuncional fueron mayores, logrando inmovilizarse una media del 50% de la proteína ofrecida en apenas 1 h. La PGA nativa no se inmovilizó sobre el soporte Eupergit-tiol por la falta de cisteínas. Una vez inmovilizados los mutantes a pH 7 se incubaron posteriormente a pH 10 para que reaccionasen los residuos nucleófilos introducidos por mutagénesis con los epóxidos del soporte e intentar así rigidificar la estructura de la proteína frente a la desestabilización.

La unión por puentes disulfuro es una unión reversible. Como muestra la electroforesis en la Figura 53 (*Resultados*), el derivado control donde la enzima está solamente unida a través de la cisteína, ya que los grupos epóxidos del soporte están bloqueados, al hervir el derivado en presencia de SDS y mercaptoetanol las dos subunidades son liberadas al sobrenadante. En el caso en que los derivados que tras el primer enlace tiol-disulfuro se han incubado posteriormente a pH 10 se ve como no hay liberación de ninguna de las dos subunidades, lo cual indica que hay enlaces covalentes establecidos con ambas subunidades de la PGA. Se puede concluir que en los soportes bifuncionales en los que se favorece la unión covalente multipuntual, la mayoría de las moléculas de enzima presentan por lo menos tres uniones al soporte: una unión reversible a través del puente disulfuro, y al menos, dos uniones irreversibles a través de los grupos epóxido del soporte (un enlace por cada subunidad de la PGA)(Grazú, 2006).

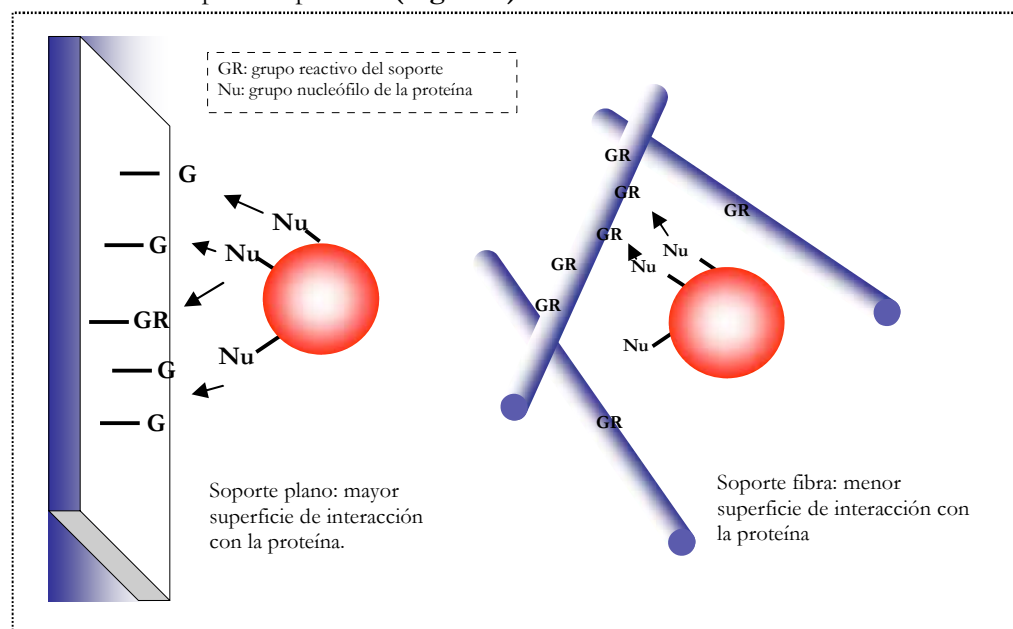
Cuando se estudió de nuevo la estabilidad frente a la temperatura o a los disolventes se volvió a observar cómo estas zonas no parece que contribuyan a una estabilización o rigidificación de la estructura. Tanto los derivados bifuncionales de los

mutantes PGAsup y PGApóst no presentan grandes diferencias comparados con sus derivados control unidos sólo a través de la cisteína. Únicamente el derivado bifuncional PGAsup logra un factor de estabilización de 4.4 veces frente al derivado control.

### 2.2.3 Falta de congruencia enzima soporte Eupergit. Inmovilización sobre agarosa glioxil.

Además de pensar en la hipótesis de que estas zonas no son esenciales para mantener la estructura de la proteína también hay que decir que los factores de estabilización para esta enzima sobre el soporte Eupergit no han sido los más óptimos comparados con los factores logrados sobre otros soportes descritos en la bibliografía.

Esto puede deberse a una falta de congruencia entre la enzima y el soporte Eupergit. El grado de congruencia geométrica entre el soporte y la enzima viene determinado por la morfología interna del soporte (Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2000a). La congruencia geométrica entre la enzima y el soporte es mayor en soportes que ofrecen una superficie plana para interactuar con las moléculas de la proteína ya que permite que un área más extensa de superficie proteica interactúe con el soporte a diferencia de los soportes tipo fibra (Figura 6).



**Figura 6.** Interacción con una superficie plana (agarosa glioxil) o interacción con soporte tipo fibra (Eupergit).

Este sería el caso de los soportes tipo agarosa glioxil cuya estructura interna ofrece grandes superficies para la interacción multipuntual con la enzima dado que está compuesto por fibras gruesas con un diámetro mayor que el de una proteína del tamaño de la PGA de *E. coli* (Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2005). Utilizando agarosa 10BCL es posible activar el soporte con una cantidad de grupos reactivos similar al Eupergit C (aproximadamente 200  $\mu$ moles grupos glioxil/ g de soporte).

Estudios previos (Grazú, 2006) han demostrado que el soporte Eupergit se comporta como un soporte con una morfología interna que no ofrece planos de interacción extensos para favorecer una multi-interacción con la superficie proteica. Aunque tampoco se debe olvidar que hay una diferencia de reactividad hacia las lisinas entre los grupos que promueven la unión covalente multipuntual en ambos soportes: grupos epóxidos en el caso de Eupergit y grupos glioxil en el caso de la agarosa.

También se han preparado soportes Eupergit que contienen grupos glioxil y se ha demostrado que la morfología interna del soporte para lograr una unión multipuntual por al menos por dos puntos que permita estabilizar la proteína es peor en el caso de soportes basados en agarosa o sepabeads (Mateo *et al.*, 2000a; Mateo *et al.*, 2002; Grazú, 2006; Hidalgo *et al.*, 2004).

Por lo tanto se decidió estudiar si los nuevos mutantes generados, PGAsup y PGApst, presentarían una mejor estabilización si se inmovilizaban sobre agarosa glioxil ya que ofrece un plano mayor de interacción con la superficie proteica. Como ambos mutantes contienen una zona diferente cada uno enriquecida en nucleófilos, sobre todo lisinas, podrían unirse covalentemente al soporte.

Se lograron inmovilizar los mutantes sobre el soporte manteniendo prácticamente su actividad tras la unión, lo cual indica que su estructura no se ha distorsionado y la conformación está intacta. Pero al estudiar los efectos de la inmovilización en la estabilidad frente a codisolventes no se observaron diferencias. El mutante PGAsup fue un poco más estable que la PGA nativa o que el derivado control, tal vez por el incremento en el número de enlaces al soporte.

El problema en este caso, es que con este tipo de soporte agarosa glioxil, no se está asegurando la inmovilización a través de la cisteína introducida ya que la proteína sólo es capaz de reaccionar con el soporte a través de las lisinas (Guisán, 1988), concretamente de la zona más enriquecida en lisinas. La PGA como se ha mostrado en la Figura 1 (*Resultados*) presenta un elevado número de lisinas en su superficie, por lo tanto los residuos

introducidos que también son lisinas, no aseguran su inmovilización por esta nueva zona generada ya que compiten con otras muchas lisinas de la superficie.

Sería necesario el desarrollo de un soporte agarosa glioxil-tiol para realmente ver el efecto de esta zona en la estabilización o no de la estructura proteica.

#### 2.2.4 Inmovilización reversible sobre soportes aniónicos.

Aprovechando la obtención de dos mutantes, PGAsup y PGApst, enriquecidos en grupos catiónicos (lys), se quiso estudiar el efecto de estas mutaciones en su inmovilización sobre intercambiadores aniónicos tipo carboximetil agarosa (ACM) y agarosa dextrano sulfato (ADS) donde la enzima nativa no es capaz de adsorberse. Sería una estrategia análoga a la modificación química con etilendiamina (EDA).

El curso de inmovilización presentado en la Figura 48 (*Resultados*) muestra como no ha sido posible su adsorción sobre estos intercambiadores catiónicos así que el incremento no ha sido suficiente para conseguir que la enzima interaccionase con los soportes.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar para estudios posteriores de adsorción otro mutante, PGAB437, previamente obtenido (Grazú, 2006). Este mutante también presenta cambios en su superficie que permiten que se adsorba sobre soportes tipo ACM como ha sido demostrado por Grazú (2006).

Este mutante presenta un enriquecimiento en 4 lisinas en una zona próxima al centro activo donde la enzima nativa ya presenta un elevado número de ellas **Figura 58 (Resultados)**. La PGAB437 presenta mutaciones que no son tan conservadoras como las realizadas anteriormente pero no afectaron a la estructura ni actividad de la enzima (Grazú, 2006).

Al inmovilizar el mutante sobre los distintos soportes se obtuvieron elevados rendimientos de inmovilización, sobre todo en el caso de la ADS, lográndose un porcentaje del 100%. Las mutaciones en este caso no se encuentran distribuidas por toda la superficie sino que están concentradas en una región próxima al centro activo, en un mismo plano, pero parece que está interaccionando mejor con el soporte recubierto con el polímero de dextrano sulfato que con el soporte convencional plano tipo ACM.

Al estudiar la fuerza de unión del mutante al soporte ACM y a ADS se observó como era necesaria una concentración de NaCl de 400 mM para comenzar a desorber la

enzima del soporte ACM y una concentración de 700 mM para comenzar a desorberla de ADS de mayor tamaño (500 kDa). Parece que el polímero está promoviendo una adsorción más intensa, un mayor número de interacciones que el soporte convencional de cromatografía (ACM) no es capaz de lograr.

También se quiso ver si se encontraba un efecto protector del polímero frente al codisolvente orgánico por el interés que el uso de la enzima presenta en reacciones en medios anhidro o de mezclas con disolventes. Se logró un factor de estabilización de 4 veces si se compara el mutante PGAB437 inmovilizado sobre agarosa DS 500 kDa frente al derivado de Fluka comercial. Una vez más se ha demostrado que el rodear la enzima de un ambiente hiperhidrofílico protege a la enzima de la inactivación del disolvente, disminuyendo la concentración efectiva de éste en su entorno, permitiendo obtener derivados interesantes para reacciones que requieran codisolventes.

## CONCLUSIONES

---

---

A modo de resumen de la presente Tesis Doctoral se quieren destacar las siguientes conclusiones:

1. La succinilación de la superficie de la enzima PGA permite el diseño de protocolos de inmovilización-estabilización de la enzima mucho más sencillos que los diseñados con la enzima sin modificar. Todas las enzimas succiniladas (desde un 20% al 100% de succinilación de lisinas) se adsorben rápidamente a soportes de agarosa recubiertos con polietilenimina con retención total de su actividad catalítica. Este protocolo de inmovilización reversible de la PGA nos permitiría reutilizar los soportes de inmovilización una vez que los catalizadores de PGA se hayan inactivado. La enzima altamente succinilada se adsorbe muy fuertemente a soportes agarosa recubiertos de polietilenimina, ya que no comienza su desorción de estos soportes hasta que se utilizan concentraciones de NaCl superiores a 300 mM. Por lo tanto estos derivados podrían utilizarse como catalizadores en la hidrólisis incluso en condiciones de moderada fuerza iónica.

2. La adsorción de PEI permite aumentar notablemente la estabilidad de los derivados frente al efecto desestabilizante de los codisolventes orgánicos. Probablemente, el entorno hipersalino donde se ha adsorbido la enzima genere algún fenómeno de reparto del disolvente disminuyendo la concentración efectiva del mismo en el entorno de las moléculas de enzima inmovilizada. De este modo, estos derivados, tan sencillos de preparar sobre soportes reutilizables, podrían ser incluso excelentes catalizadores de procesos químicos de síntesis de antibióticos en presencia de concentraciones de disolventes orgánicos moderadamente altas.

3. Utilizando PGA parcialmente succinilada (un 20% de los residuos de lys) se pudo diseñar un nuevo método de inmovilización basado en la adsorción de la enzimas sobre soportes agarosa PEI y el posterior entrecruzamiento con glutaraldehído de residuos de lisina de la enzima y residuos amino primarios de la polietilenimina.

4. La PGA enriquecida en aminos permite optimizar su inmovilización multipuntual sobre soportes agarosa glioxil. El mayor factor de estabilización se consigue cuando la enzima aminada al 50% se inmoviliza a pH 9.0 orientándose sobre el soporte a través de los nuevos grupos amino introducidos y posteriormente se incuba a pH 10.0 para optimizar la unión covalente multipuntual entre todos los residuos amino de esta región de la enzima y todos los grupos glioxil del soporte. Estos derivados conservan el 90% de la actividad después de incubarse a 66°C durante 100 horas mientras que los mejores derivados de la enzima sin modificar sólo conservan un 30 % de actividad después de una

incubación en las mismas condiciones.

5. La enzima aminada también se adsorbe muy intensamente y reversiblemente sobre soportes agarosa recubiertos con dextrano sulfato. La adsorción es rápida con recuperación completa de actividad y una interesante estabilización frente al efecto de los codisolventes orgánicos. De nuevo parece que la película polimérica sobre la que se ha adsorbido la enzima disminuye (por fenómenos de reparto) la concentración de dioxano en las proximidades del centro activo de la enzima. Según experimentos de inhibición por codisolventes podríamos considerar que la concentración de codisolvente en el entorno del centro activo de la enzima es un 30-40% menor que la concentración en la solución. Esto implica una mayor estabilidad y un efecto inhibidor menor.

6. El aumento de 8 glutámicos en la superficie de la PGA mediante mutagénesis dirigida ha permitido inmovilizar la enzima sobre intercambiadores aniónicos, proceso que no era posible con la enzima nativa. Tras el análisis *in silico* de la estructura de la proteína se introdujeron las 8 mutaciones que no afectaron ni a la estructura ni al plegamiento de la proteína, permitiendo unos niveles de expresión y propiedades similares a la nativa. Tras su inmovilización sobre soportes agarosa PEI 600 kDa se logró estabilizar la proteína frente a disolventes gracias a esta nueva interacción con el polímero. Éste ejerce un efecto protector entorno a la enzima ya que al estar distribuidas las mutaciones por toda la superficie, la enzima es capaz de multi-interaccionar y embeberse en él.

7. La interacción del mutante PGA8glu con la PEI ha permitido el desarrollo de una nueva estrategia de estabilización frente a disolventes orgánicos. En ella se combina una inmovilización covalente sobre el soporte agarosa glioxil junto con la coinmovilización de la enzima con la PEI obteniendo factores de estabilización superiores a la simple adsorción de la enzima sobre el soporte agarosa PEI

8. Se han obtenido dos mutantes de PGA que presentan nuevas zonas en su superficie enriquecidas en residuos nucleófilos. Se han generado nuevas zonas a través de las cuales la PGA nativa no es capaz de reaccionar con los soportes tiol-epóxido. Introduciendo residuos es posible explorar la superficie en busca de zonas que permitan estabilizar la proteína. Las dos zonas estudiadas en los mutantes PGAsup y PGApst no parecen estar implicadas en una rigidificación de la estructura a la vista de los resultados obtenidos en los estudio de estabilización. También es posible una falta de congruencia entre la enzima y el soporte, siendo necesario el diseño de nuevos soportes.



9. El mutante PGA 437 es capaz de adsorberse intensamente sobre soportes agarosa dextrano sulfato, siendo necesaria una concentración de NaCl de 700 mM para comenzar su desorción del soporte. Como se había observado en el caso de la enzima aminada se logra un efecto protector frente al disolvente por el efecto del reparto en el entorno de la proteína.

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

- Abián, O. (2003) Diferentes estrategias de estabilización de penicilina G acilasa de *E. coli* frente a disolventes orgánicos, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Abián, O., Grazú, V., Hermoso, J., González, R., García, J. L., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2004a). Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*: Site-Directed Mutagenesis of the Protein Surface to Increase Multipoint Covalent Attachment. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1249-1251.
- Abián, O., Mateo, C., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2004b). Enantioselective synthesis of phenylacetamides in the presence of high organic cosolvent concentrations catalyzed by stabilized penicillin G acylase. Effect of the acyl donor. *Biotechnology Progress* 20, 984-988.
- Abián, O., Wilson, L., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., Re, D., Tam, A., y Daminatti, M. (2002). Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, 295-303.
- Alcalde, M., Plou, F. J., Pastor, E., y Ballesteros, A. (1998). Effect of chemical modification of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. on its activity y product selectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 864, 183-187.
- Alkema, W. B. L., Dijkhuis, A. J., De Vries, E., y Janssen, D. B. (2002). The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. *European Journal of Biochemistry* 269, 2093-2100.
- Alkema, W. B. L., Hensgens, C. M. H., Kroezinga, E. H., De Vries, E., Floris, R., Van der Laan, J. M., Dijkstra, B. W., y Janssen, D. B. (2000). Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. *Protein Engineering* 13, 857-863.
- Alvaro, G. (1988) Inmovilización y estabilización de penicilina G acilasa. Posibles usos industriales. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Alvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Blanco, R. M., y Guisán, J. M. (1990). Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 26, 181-195.
- Andersson, M. M., y Hatti-Kaul, R. (1999). Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *Journal of Biotechnology* 72, 21-31.
- Anti-infectives, D. (2004). DSM Pure actives TM a new standard in antibiotics. DMS Press Release, Delft, 7 December 2004.
- Antrim, R. L., y Auterinen, A. L. (1986). A new regenerable immobilized glucose isomerase. *Stärke* 38, 132-137.
- Arica, M. Y., y Bayramoglu, G. (2006). Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38, 131-138.
- Arnold, U., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., y Ulbrich, R. (1996). Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *Eur J Biochem* 237, 862-869.

- Arnold, U., Schierhorn, A., y Ulbrich, R. (1998). Influence of the carbohydrate moiety on the proteolytic cleavage sites in ribonuclease B. *J Protein Chem* 17, 397-405.
- Arroyo, M., De La Mata, I., Acebal, C., y castillón, M. P. (2003). Biotechnological applications of penicillin acylases: state of the art. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 507-514.
- Arroyo, M., Torres-Guzman, R., De la Mata, I., Castillon, M. P., y Acebal, C. (2002). A kinetic examination of penicillin acylase stability in water-organic solvent systems at different temperatures. *Biocatalysis y Biotransformation* 20, 53-56.
- Bachmann, R. (2003). Industrial Biotechnology-New value creation opportunities., In Bioconference (New York).
- Bahulekar, R., Ayyangar, N. R., y Ponrathnam, S. (1991). Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 858-868.
- Barends, T. R., Yoshida, H., y Dijkstra, B. W. (2004). Three-dimensional structures of enzymes useful for beta-lactam antibiotic production. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 356-363.
- Basso, A., De Martín, L., Ebert, C., Gardossi, L., y Linda, P. (2001). Selectivity of penicillin G acylase towards phenylacetic acid derivatives in amide bond synthesis in toluene. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 16, 73-80.
- Baumeister, A., Vogelman, S., y Fisher, L. (2003). Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system. *J Chromatogr A* 1006, 261-265.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., y J.R., H. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81, 3684-3690.
- Bes, M. T., Gomez-Moreno, C., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (1995). Selective oxidation: stabilisation by multipoint attachment of ferredoxin NADP+ reductase, an interesting cofactor recycling enzyme. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 98, 161-169.
- Bickerstaff, G. F. E. (1997). *Methods in Biotechnology: Immobilizations of enzymes and cells. Vol 1* (Totowa, NJ: Humana Press Inc.).
- Blanco, R. M., Calvete, J. J., y Guisán, J. M. (1989). Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 353-359.
- Blanco, R. M., y Guisán, J. M. (1989). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 360-366.
- Bogin, O., Peretz, M., Hacham, Y., Korkhin, Y., Frolov, F., Kalb, A. J., y Burstein, Y. (1998). Enhance thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residue with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase. *Protein Sci* 7, 1156-1163.

- Boller, T., Meier, C., y Menzler, S. (2002). Eupergit oxirane acrylic beads: How to make enzymes fit for biocatalysis. *Organic Process Research and Development* 6, 509-519.
- Bornscheuer, U. T., y Pohl, P. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 137-143.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brena, B. M., Ryden, L. G., y Porath, J. (1994). Immobilization of beta-galactosidase on metal-chelate-substituted gels. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 19, 217-231.
- Brugger, R., Kronenberg, A., Bishoff, A., Hug, D., y Lehmann, M. (2001). Thermostability engineering of fungal phytases using low-M<sub>r</sub> additives and chemical crosslinking. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 505-516.
- Bruggink, A., Roos, E. C., y De Vroom, E. (1998). *Organic Process Research and Development* 2, 128-133.
- Bruggink, A., y Roy, P. D. (2001). *Synthesis of beta-lactam Antibiotics* (Dordrecht: Kluwer).
- Brünger, A. T., Krukowski, A., y Erickson, J. (1990). Slow cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallogr A* 46, 585-593.
- Bryjak, J. (1995). Storage stabilization of enzyme activity by poly(ethyleneimine). *Bioprocess Engineering* 13, 177-181.
- Buchholz, K. (1979). Characterization of immobilized biocatalysts; in *DECHEMA Monograph*, Vol 84 (Weinheim: VCH).
- Buchholz, K., Kasche, V., y Bornscheuer, U. T. (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., y Caccialanza, G. (2004). Penicillin G acylase-based stationary phases: Analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, 243-258.
- Carlsson, J., Axén, R., y Unge, T. (1975). Reversible, covalent immobilization of enzymes by thiol-disulphide interchange. *Eur J Biochem* 59, 567-572.
- Carraway, K. L., Spoerl, P., y Koshland, D. E. (1969). Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen. *Journal Molecular Biology* 42, 133-137.
- Claridge, C. A., Gourevitch, A., Lein, J., y (1960). Bacterial penicillin amidase. *Nature* 187, 237-238.
- Clark, D. S., y Bailey, J. E. (1983). Structure-function relationships in immobilized chymotrypsin catalysis. *Biotechnology and Bioengineering* 25, 1027-1047.
- Clarke, J., y Fersht, A. R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* 32, 4322-4329.

- Creighton, T. E., y Freedman, R. B. (1993). Protein structure: A model catalyst of protein disulphide bond formation. *Current Biology* 3, 790-793.
- Chen, W. D., Tong, X. D., Dong, X. Y., y Sun, Y. (2003). Expanded bed adsorption of protein with DEAE spherodex M. *Biotechnology Progress* 19, 880-886.
- Cherry, J. R., y Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 438-443.
- Chibata, I., y Tosa, T. (1976). Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. , Vol 1 (London: London: Academic Press.).
- Chikere, A. C., Galunsky, B., Schu?nemann, V., y Kasche, V. (2001). Stability of immobilized soybean lipoxygenases: Influence of coupling conditions on the ionization state of the active site Fe. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 168-175.
- Chirumamilla, R. R., Muralidhar, R., Marchant, R., y Nigam, P. (2001). Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Molecular and Cellular Biochemistry* 224, 159-168.
- Chiti, F., Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., y Dobson, C. M. (2002). Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insight into the genetics of amyloid diseases. *Proc Acad Sci USA* 99, 16419-16426.
- Davis, B. G. (2003). Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 379-386.
- Davis, S. J., Davies, E. A., Tucknott, M. G., Jones, E. Y., y Van Der Merwe, P. A. (1998). The role of charged residues mediating low affinity protein-protein recognition at the cell surface by CD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5490-5494.
- Dayhoff, M. O., Barker, W. C., y Hunt, L. T. (1995). *Methods in Enzymology* 91, 524.
- De Martin, L., Ebert, C., Garau, G., Gardossi, L., y Linda, P. (1999). Penicillin G amidase in low-water media: Immobilisation and control of water activity by means of celite rods. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 6, 437-445.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL. Molecular Graphics System.
- Desmukth, S. S., Duta, M., Choudohury, S., y Shanker, V. (1993). Preparation and properties of glucose isomerase immobilized on indon 48-R. *Applied Biochem Biotechnol* 42, 95-104.
- Didziapetris, R. J., y Svedas, V. K. (1991). Penicillin acylase-catalyzed acyl group transfer to amino acids, their esters and peptides: A kinetic study. *Biomedica Biochimica Acta* 50, S237-S242.
- Dong, F., Vijayakumar, M., y Zhou, H. X. (2003). Comparison of calculation and experiment implicates significant electrostatic contributions to the binding stability of barnase and barstar. *Biophysical Journal* 85, 49-60.
- Doyle, S. M., Anderson, E., Zhu, D., Braswell, E. H., y Teschke, C. M. (2003). Rapid unfolding of a domain populates an aggregationprone intermediate that can be recognazide by GroEL. *J Mol Biol* 332, 937-951.

- Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, G. P., Dodson, E. J., Dodson, G., y Moody, P. C. E. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* *373*, 264-268.
- Eijssink, V. G. H., Bjørk, A., Ga?seidnes, S., Sireva?g, R., Synstad, B., Burg, B. V. D., y Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology* *113*, 105-120.
- Eijssink, V. G. H., Veltman, O. R., Aukema, W., Vriend, G., y Venema, G. (1995). Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteases. *Nature Struct Biol* *2*, 374-379.
- Engh, R. A., y Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. . *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* *47*, 392-400.
- Faber, K. (1996). *Biotransformations in Organic Chemistry* (New York: Springer).
- Fernández-Lafuente, R., Cowan, D. A., y Wood, A. N. P. (1995a). Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* *17*, 366-372.
- Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (1998). Enzyme and protein engineering via immobilization and post immobilization techniques. *Recent Res Develop Biotechnol Bioeng* *1*, 299-309.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodríguez, V., y Guisán, J. M. (1995b). Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme and Microbial Technology* *17*, 517-523.
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Penzol, G., Hernández-Justiz, O., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista, F., y Guisán, J. M. (1999a). Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* *7*, 181-189.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., Alvaro, G., y Guisán, J. M. (1992). Additional stabilization of penicillin G acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde. *Enzyme and Microbial Technology* *14*, 489-495.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., Caanan-Haden, L., Rodes, L., y Guisán, J. M. (1999b). Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. . *Enzyme and Microbial Technology* *24*, 96-103.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., y Guisán, J. M. (1991). Enzyme reaction engineering: Synthesis of antibodies catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. *Enzyme y Microbial Technology* *13*, 898-905.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., y Guisán, J. M. (1996). Dynamic reaction design of enzymic biotransformations in organic media: Equilibrium-controlled synthesis of antibiotics by penicillin G acylase. *Biotechnology y Applied Biochemistry* *24*, 139-143.

- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodríguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., y Guisán, J. M. (1993). Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme y Microbial Technology* 15, 546-550.
- Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Mateo, C., y Guisán, J. M. (2000). Engineering of enzymes via immobilization y post immobilization techniques. Preparation of enzyme derivatives with improved stability in organic media. *Methods in non-aqueous enzymology*: Birkhauser Verlag AG).
- Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F. J., Martiñez, M. J., Van Berkel, W. J. H., y Martiñez, A. T. (2006). Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing ligninolytic enzyme. *FEBS Journal* 273, 4878-4888.
- Ferrer, M., Plou, F. J., Fuentes, G., Cruces, M. A., Andersen, L., Kirk, O., Christensen, M., y Ballesteros, A. (2002). Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. *Biocatalysis Biotransformations* 20, 63-71.
- Finke, J. M., Roy, M., Zimm, B. H., y Jennings, P. A. (2000). Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1beta. *Biochemistry* 39, 575-583.
- Fite, M., Capellas, M., Benaiges, M. D., Caminal, G., Clapes, P., y Alvaro, G. (1997). N-protection of amino acid derivatives catalyzed by immobilized penicillin G acylase. *Biocatalysis y Biotransformation* 14, 317-332.
- Frances H. Arnold, P. L. W., Kentaro Miyazaki y Anne Gershenson (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 100-106.
- Fuentes, M., Maquiese, J. V., Pessela, B. C. C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., y Guisán, J. M. (2004a). New Cationic Exchanger Support for Reversible Immobilization of Proteins. *Biotechnology Progress* 20, 284-288.
- Fuentes, M., Maquiese, J. V., Pessela, B. C. C., Torres, R., Grazú, V., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., y Mateo, C. (2006). Use of polyvalent cations to improve the adsorption strength between adsorbed enzymes y supports coated with dextran sulfate. *Enzyme y Microbial Technology* 39, 332-336.
- Fuentes, M., Palomo, J. M., Mateo, C., Venteo, A., Sanz, A., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2005). Optimization of the modification of carrier proteins with aminated haptens. *Journal of Immunological Methods* 307, 144-149.
- Fuentes, M., Pessela, B. C. C., Maquiese, J. V., Ortiz, C., Segura, R. L., Palomo, J. M., Abián, O., Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2004b). Reversible y strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. *Biotechnology Progress* 20, 1134-1139.
- Gao, J., Mammen, M., y Whitesides, G. M. (1996). Evaluating electrostatic contributions to binding with the use of protein charge ladders. *Science* 272, 535-537.



- Geoghegan, K. F. (1996). *Current Protocols in Protein Science* (New York: Wiley).
- Gianfreda, L., y Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular y Cellular Biochemistry* 109, 97-128.
- Giordano, R. C., Ribeiro, M. P. A., y Giordano, R. L. C. (2006). Kinetics of  $\beta$ -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology Advances* 24, 27-41.
- Gitlin, I., Carbeck, J. D., y Whitesides, G. M. (2006). Why are proteins charged? Networks of charge interactions in Proteins measured by charge ladders y capillary electrophoresis. *Angew Chem Int* 45, 3022-3060.
- Glaser, J. A. (2005). White Biotechnology. *Clean Techn Environ Policy* 7, 233-235.
- Gololobov, M. Y., Voyushina, L. T., Stepanov, V. M., y Aldlercreutz, P. (1992). Organic solvent changes the chymotrypsin specificity with respect to nucleophiles. *FEBS Letters* 307, 309-312.
- González, P., Batista-Viera, F., y Brena, B. M. (2004). Polyethylenimine coated agarose supports, for the reversible immobilisation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Biotechnology* 6, 338-345.
- Grazú, V. (2006) Estabilización de penicilina G acilasa por inmovilización covalente multipuntual dirigida. Mutagénesis de la superficie de la enzima para mejorar la complementariedad enzima-soporte activado., Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Grazú, V., Abián, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2003). Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules* 4, 1495-1501.
- Guisán, J. M. (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes *Enzyme y Microbial Technology* 10, 375-382.
- Guisán, J. M., Alvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Rosell, C. M., Garcia, J. L., y Tagliani, A. (1993). Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnology y Bioengineering* 42, 455-464.
- Guncheva, M., Ivanov, I., Galunsky, B., Stambolieva, N., y Kaneti, J. (2004). Kinetic studies y molecular modelling attribute a crucial role in the specificity y stereoselectivity of penicillin acylase to the pair ArgA145-ArgB263. *European Journal of Biochemistry* 271, 2272-2279.
- Gupta, M. N. (1991). Thermostabilization of proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 14, 1-11.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- Hao, J., Wang, Y., Yuan, C., y Sun, M. (2006). Chemical modification of marine *Pseudomonas* QD80 cold alkaline protease. *Chinese Journal of Applied y Environmental Biology* 12, 371-374.

- Hartmeier, W. (1985). Immobilized biocatalysts -- From simple to complex systems. *Trends in Biotechnology* 3, 149-153.
- Hasawaga, J., Shimahara, H., Mizutabi, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Feguson, S. J., Sambongi, Y., y Igarashi, Y. (1999). Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome C<sub>551</sub> by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome C<sub>552</sub>. *J Biol Chem* 274, 37533-37537.
- Hawrani, A. E., Moreton, K. M., Sessions, R. B., Clarke, A. R., y Holbrook, J. J. (1994). Engineering surface loops of proteins - a preferred strategy for obtaining new enzyme function. *Trends in Biotechnology* 12, 207-211.
- Hemarson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Vol 57 (California).
- Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R. J., Murshudov, G. N., Verma, C. S., Dodson, G. G., y Wilson, K. S. (2000). Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. *Journal of Molecular Biology* 302, 887-898.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Mateo, C., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2004). Purification of a catalase from *Thermus thermophilus* via IMAC chromatography: Effect of the support. *Biotechnology Progress* 20, 1578-1582.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., y Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Hoare, D. G., y Koshland Jr, D. E. (1967). A method for the quantitative modification y estimation of carboxylic acid groups in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 242, 2447-2453.
- Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S., y Kagamiyana, H. (1999). Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J Biochem* 126, 951-956.
- Hu, J. C., Newell, N. E., Tidor, B., y Sauer, R. T. (1993). *Protein Science* 2, 1072-1084.
- Huang, H. T., English, A. R., Seto, G. M., Shull, B. A., y Sobin, B. A. (1960). *J Am Chem Soc* 82, 3790-3791.
- Huang, W., Wang, J., Bhattacharyya, D., y Bachas, L. G. (1997). Improving the activity of immobilized subtilisin by site-specific attachment to surfaces. *Anal Chem* 69, 4601-4607.
- Hult, K., y Berglund, P. (2003). Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 395-400.
- Hunt, P. D., Tolley, S. P., Ward, R. J., Hill, C. P., y Dodson, G. G. (1990). Expression, purification y crystallization of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Prot Eng* 3, 635-639.
- Hwang, S., Lee, K. T., Park, J. W., Min, B. R., Haam, S. J., Ahn, I. S., y Jung, J. K. (2004). *Biomchem Eng J* 17, 85.

- Iberer, G., Schwinn, H., Josic, D., Jungbauer, A., y Buchacher, A. (2001). Improved performance of protein separation by continuous annular chromatography in the size-exclusion mode. *J Chromatogr A* 921, 15-24.
- Ichikawa, S., Takano, K., Kuroiwa, T., Hiruta, O., Sato, S., y Mukataka, S. (2002). Immobilization y stabilization of chitosanase by multipoint attachment to agar gel support. *Journal of Bioscience y Bioengineering* 93, 201-206.
- Ignatova, Z., Enfors, S. O., Hobbie, M., Taruttis, S., Vogt, C., y Kasche, V. (2000). The relative importance of intracellular proteolysis y transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. *Enzyme y Microbial Technology* 26, 165-170.
- Ignatova, Z., Wischniewski, F., Notbohm, H., y Kasche, V. (2005). Pro-sequence y  $\text{Ca}^{2+}$ -binding: Implications for folding y maturation of Ntn-hydrolase penicillin amidase from *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* 348, 999-1014.
- Illanes, A., y Fajardo, A. (2001). Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 11, 587-595.
- Inada, Y., Yoshimoto, T., Matsushima, A., y Saito, Y. (1986). Engineering physicochemical y biological properties of proteins by chemical modification. *Trends in Biotechnology* 4, 68-73.
- Ishii, Y. (1994). The local y global unfolding of coiled-coil tropomyosin. *Eur J Biochem* 221, 705-712.
- Iwakura, M., y Kokubu, T. (1993). Immobilization of dihydrofolate reductase by engineered cysteine residue attached to its C-terminal end. *Journal of Biochemistry* 114, 339-343.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., y MacKinnon, R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channel. *Nature* 423, 42-48.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., y Kjeldgaard (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps y the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* 47, Pt 2/.
- Kallenberg, A. I., Van Rantwijk, F., y Sheldon, R. A. (2005). Immobilization of penicillin G acylase: The key to optimum performance. *Advanced Synthesis y Catalysis* 347, 905-926.
- Karplus, P. A., Daniels, M. J., y Herriott, J. R. (1991). Atomic structure of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251 (4989), 60-66.
- Kasche, V. (1986). Mechanism y yields in enzyme catalysed equilibrium y kinetically controlled synthesis of beta-lactam antibiotics, peptides y other condensation products. *Enzyme y Microbial Technology* 8, 4-16.
- Kasche, V., Galunsky, B., y Ignatova, Z. (2003). Fragments of pro-peptide activate mature penicillin amidase of *Alcaligenes faecalis*. *European Journal of Biochemistry* 270, 4721-4728.

- Kasche, V., Ignatova, Z., Maßkl, H., Plate, W., Punckt, N., Schmidt, D., Wiegandt, K., y Ernst, B. (2005).  $\text{Ca}^{2+}$  is a cofactor required for membrane transport y maturation y is a yield-determining factor in high cell density penicillin amidase production. *Biotechnology Progress* 21, 432-438.
- Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S., y Voelter, W. (1999). Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure y Molecular Enzymology* 1433, 76-86.
- Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes -- learning from past successes y failures. *Trends in Biotechnology* 11, 471-478.
- Katchalski-Katzir, E., y Kraemer, D. M. (2000). Eupergit(R) C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 157-176.
- Kaufmann, W., y Bauer, K. (1960). *Naturwiss* 47, 474-475.
- Kawase, M., Takahashi, H., Sonomoto, K., Nakamura, K., y Tanaka, A. (1991). Effect of chemical modification of tyrosine residues on activities of bacterial lipase. *Journal of Fermentation y Bioengineering* 72, 317-319.
- Kawase, M., y Tanaka, A. (1989). Effects of chemical modification of amino acid residues on the activities of lipase from *Candida cylindracea*. *Enzyme y Microbial Technology* 11, 44-48.
- Kazan, D., y Erarslan, A. (2001). Identification of catalytically essential amino acid residues of penicillin G acylase obtained from a mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Process Biochemistry* 36, 861-867.
- Kennedy, J. F., Melo, E. H. M., y Jumel, K. (1990). Immobilized enzymes y cells. *Chemical Engineering Progress* 86, 81-89.
- Khajeh, K., Naderi-Madash, H., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A., y Nemat-Gorgani, M. (2001). Chemical modification of lysine residues in *Bacillus alpha*-amylases: effect on activity y estability. *Enzyme y Microbial Technology* 28, 229-237.
- Khalaf, N., Govardhan, C., Lalonde, J., Persichetti, R., Wang, Y., y Margolin, A. L. (1996). Cross-linked enzyme crystals as high active catalysts in organic solvents. *J Am Chem Soc* 118, 5494-5495.
- Kim, M. G., y Lee, S. B. (1996). Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: Interaction of organic solvents with enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 1, 181-190.
- Klibanov, A. M. (1983a). Approaches to enzyme stabilization. *Biochemical Society Transactions* 11, 19-20.
- Klibanov, A. M. (1983b). Enzymes: Nature's chemical machines. *Technology review* 86, 40-48, 50.
- Klibanov, A. M. (1983c). Immobilized enzymes y cells as practical catalysts. *Science* 219, 722-727.
- Klibanov, A. M. (1983d). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology* 29, 1-28.

- Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Nature* 409, 241-246.
- Klotz, I. M. (1967). Succinylation. *Methods Enzymol* 11, 576-580.
- Kumar, A., Galaev, I. Y., y Mattiasson, B. (2000). Polymer displacement/shielding in protein chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences y Applications* 741, 103-113.
- Kumar, S., y Nussinov, R. (2004). Experiment-guided thermodynamic simulations on reversible two-state proteins: Implications for protein thermostability. *Biophysical Chemistry* 111, 235-246.
- Kutzbach, C., y Rauenbusch, E. (1974). Preparation y general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *HOPPE-SEYLER'S ZPHYSIOLCHEM* 355, 45-53.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leckband, D., y Langer, R. (1991). An approach for the stable immobilization of proteins. *Biotechnology y Bioengineering* 37, 227-237.
- Lee, L. P., y Tidor, B. (2001). Barstar is electrostatically optimized for tight binding to barnase. *Nature Structural Biology* 8, 73-76.
- Lenders, J. P., y Crichton, R. R. (1984). Thermal stabilization fo amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Biotechnology Bioengineering* 26, 1343-1351.
- Lindsay, J. P., Clark, D. S., y Dordick, J. D. (2004). Combinatorial formulation of biocatalyst preparations for increased activity in organic solvents: Salt activation of penicillin amidase. *Biotechnology y Bioengineering* 85, 553-560.
- Liu, H. L., Doleyres, Y., Coutinho, P. M., Ford, C., y Reilly, P. J. (2000). Replacement y deletion mutations in the catalytic domain y belt region of *Aspergillus awamori* glucoamylase to enhance thermostability. *Protein Engineering* 13, 655-659.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2004). Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. *Journal of Biotechnology* 111, 219-227.
- López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazú, V., Betancor, L., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2005). Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology* 116, 1-10.
- Luk, Y. Y., Tingey, M. L., Dickson, K. A., Raines, R. T., y Abbott, N. L. (2004). Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals. *Journal of the American Chemical Society* 126, 9024-9032.
- Lundblad, R. L. (1991). Chemical reagents for protein modification. (Boca Ratón. Florida: CRC Press).

- Lundovskikh, I.A., Dementieva, E.I. y Ugarova, N.N. (1998) Immobilization of recombinant firefly luciferase. Physicochemical properties and application. *Biochemistry* 63, 691-6.
- Luo, S., Kim, G., y Levine, R. L. (2005). Mutation of the Adenylylated Tyrosine of Glutamine Synthetase Alters Its Catalytic Properties. *Biochemistry* 44, 9441-9446.
- Lyddiatt, A. (2002). Process chromatography: Current constraints y future options for the adsorptive recovery of bioproducts. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 95-103.
- Machius, M., Declerck, N., Huber, R., y Wiegand, G. (2003). Kinetic stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface. *J Biol Chem* 278, 11546-11553.
- Madoz-Gúrpide, J., Abad, J. M., Fernández-Recio, J., Velez, M., Vázquez, M., y Fernández, V. M. (2000). Modulation of electroenzymatic NADPH oxidation through oriented immobilization of ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase onto modified gold electrodes. *J Am Chem Soc* 122, 9808-9817.
- Maeda, N., Kanai, T., Atomik, H., y Imanaka, T. (2002). The unique pentagonal structure of an archeal rubisco is essential for its high thermostability. *J Biol Chem* 277, 31656-31662.
- Mansfeld, J., y Ulbrich-Hofmann, R. (2000). Site-specific y random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics". *Biotechnol Appl Biochem* 32, 185-195.
- Mansfeld, J., y Ulbrich, R. (2000). Site-specific y random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics. *Biotechnology y Applied Biochemistry* 32, 185-195.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B. W., Veltman, O. R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., y Eijssink, V. G. H. (1997). Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J Biol Chem* 272, 11152-11156.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van Den Burg, B., Eijssink, V. G. H., y Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry* 38, 8240-8245.
- Martinek, K., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S., y Berezin, I. V. (1977). The principles of enzyme stabilization: I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta* 485, 1-12.
- Mateo, C., Abián, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Grazú, V., Pessela, B. C. C., Giacomini, C., *et al.* (2005). Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme y Microbial Technology* 37, 456-462.
- Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2000a). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme y Microbial Technology* 26, 509-515.

- Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2000b). Reversible enzyme immobilization via a very strong y nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology y Bioengineering* 68, 98-105.
- Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2002). Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress* 18, 629-634.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abián, O., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2000c). Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 1, 739-745.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Cortés, E., García, J. L., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2001). One-step purification, covalent immobilization, y additional stabilization of poly-his-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. *Biotechnology y Bioengineering* 76, 269-276.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazú, V., López-Gallego, F., Pessela, B. C. C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2006a). Glyoxyl agarose: A fully inert y hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins. *Enzyme y Microbial Technology* 39, 274-280.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazú, V., López-Gallego, F., Pessela, C. C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2006b). Glyoxyl-agarose: a fully inert hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* 39, 274-280.
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abián, O., Palomo, J. M., Betancor, L., *et al.* (2003). Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4, 772-777.
- Mathatadze, G. I., Loladze, V. V., Ermolenko, D. N., Chen, X. F., y Thomas, S. T. (2003). Contribution of surface salt bridges tor protein stability: guidelines for protein engineering. *J Mol Biol* 327, 1135-1148.
- Matsumura, M., Signor, G., y Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* 342, 291-293.
- Matthews, B. W., Nicholson, H., y Becktel, W. J. (1987). Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease entropy of unfolding. *Proc Acad Sci USA* 84, 6663-6667.
- McLanahan, E. D. (2003). Penicillin G acylase. An enzyme of great pharmaceutical importance.
- McVey, C. E., Walsh, M. A., Dodson, G. G., Wilson, K. S., y Brannigan, J. A. (2001). Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes:

- Structural insights into the catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology* 313, 139-150.
- Melander, W. R., Corradini, D., y Horvath, C. (1984). Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory. *Journal of Chromatography* 317, 67-85.
  - Merino, E., Balbas, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F., y Bolivar, F. (1992). Carbon regulation y the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (pac) gene. *Molecular Microbiology* 6, 2175-2182.
  - Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettigell, C. Sturtevant, J. y King, J. (1991). Global supression of protein folding defects and inclusion body formation, *Science* 275, 31219-31225.
  - Monsan, P. (1978). Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis* 3, 371-384.
  - Morillas, M., Goble, M. L., y Virden, R. (1999). The kinetics of acylation y deacylation of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105: Evidence for lowered pK(a) values of groups near the catalytic centre. *Biochemical Journal* 338, 235-239.
  - Morillas, M., McVey, C. E., Brannigan, J. A., Ladurner, A. G., Forney, L. J., y Virden, R. (2003). Mutations of penicillin acylase residue B71 extend substrate specificity by decreasing steric constraints for substrate binding. *Biochemical Journal* 371, 143-150.
  - Mozhaev, V. V., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S., y Bezerin, I. V. (1990). Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnology y Bioengineering* 25, 1937-1945.
  - Nahalka, J., y Gemeiner, P. (2006). Thermoswitched immobilization. A novel approach in reversible immobilization. *J of Biotechnol* 123, 478-482.
  - Nanalov, R., Kamboure, M. S., y Emanuiloda, E. I. (1993). Immobilization y properties of *Bacillus Stearothermophilus* pulanase. *Biotechnology y Applied Biochemistry* 118, 409-416.
  - Nicholls, A., Sharp, K., y Honig, B. (1991). Proteins folding y association: insights from the interfacial y thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11, 281-296.
  - Ó'Fágáin, C. (2003). Enzyme stabilization-recent experimental progress. *Enzyme y Microbial Technology* 33, 137-149.
  - Oinonen, C., y Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Science* 9, 2329-2337.
  - Olsson, I., Axiö-Fredriksson, U. B., Degerman, M., y Olsson, B. (1988). Fast horizontal electrophoresis. I. Isoelectric focusing y polyacrylamide gel electrophoresis using PhastSystem. *Electrophoresis* 9, 16-22.
  - Ovsejevi, K., Manta, C., y Carlsson, J. A. (1991). A new method for the reversible immobilization of tiol biomolecules based on solid phase bound thiosulfonates groups. *Appl Biochem Biotechnol* 31, 175-195.



- Park, Y. S. (2006). Identification of amino acid residues involved in xylanase activity from *Bacillus alcalophilus* AX2000 by chemical modifiers. *Korean Journal of Microbiology y Biotechnology* 34, 121-128.
- Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S. S., y Kennedy, J. F. (2000). Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnology Advances* 18, 289-301.
- Paula, L., y Birrer, F. (2006). Including public perspectives in industrial biotechnology y biobased economy. *Journal of Agricultural y Environmental Ethics* 19, 253-267.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., y Schmid, F. X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural Biology* 7, 380-383.
- Perl, D., y Schmid, F. X. (2001). Electrostatics stabilization of the thermophilic cold shock protein. *J Mol Biol* 313, 343-357.
- Persichetti, R., Clair, N., Griffith, J., Navia, M., y Margolin, A. L. (1995). Cross-linked Crystals of Thermolysin in the synthesis of peptides. *J Am Chem Soc* 117, 2732-2737.
- Persson, M., Bulow, L., y Mosbach, K. (1990). Purification y site-specific immobilization of genetically engineered glucose dehydrogenase on Thiopropyl-Sepharose. *FEBS Letters* 270, 41-44.
- Pessela, B. C. C., Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Torres, R., Dellamora-Ortiz, G. M., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., y Mateo, C. (2005). Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. *Enzyme y Microbial Technology* 37, 295-299.
- Pessela, B. C. C., Fernández-Lafuente, R., Fuentes, M., Viañ, A., Garcíª, J. L., Carrascosa, A. V., Mateo, C., y Guisán, J. M. (2003). Reversible immobilization of a thermophilic beta-galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme y Microbial Technology* 32, 369-374.
- Petersen, S. B., Harald Jonson, P., Fojan, P., Petersen, E. I., Neves Petersen, M. T., Hansen, S., Ishak, R. J., y Hough, E. (1998). Protein engineering the surface of enzymes. *Journal of Biotechnology* 66, 11-26.
- Petzelbauer, I., Kuhn, B., Splechtna, B., Kulbe, K. D., y Nidetzky, B. (2002). Development of an ultrahigh-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable  $\beta$ -glycosidases y optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion. *Biotechnology y Bioengineering* 77, 619-631.
- Plapp, B. V. (1995). Site-directed mutagenesis: a tool for studying enzyme catalysis. *Methods in Enzymology* 249, 91-119.
- Poincet, T., y Parris, K. (2004). Biomass y agriculture. Sustainability, Markets y Policies (OECD-report).
- Ponder, J. W., y Richards, F. M. (1987). Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *Journal of Molecular Biology* 193, 775-791.

- Prieto, M. A., Diaz, E., y Garcia, J. L. (1996). Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J Bacteriol* *178*, 111-120.
- Rao, C. S. (2001). Purification of large proteins using ion-exchange membranes. *Process Biochemistry* *37*, 247-256.
- Rocchietti, S., Urrutia, A. S. V., Pregnolato, M., Tagliani, A., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., y Terreni, M. (2002). Influence of the enzyme derivative preparation y substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. *Enzyme y Microbial Technology* *31*, 88-93.
- Roche, D., Prasad, K., y Repic, O. (1999). Enantioselective acylation of  $\beta$ -aminoesters using penicillin G acylase in organic solvents. *Tetrahedron Letters* *40*, 3665-3668.
- Rolinson, G. N., Batchelor, F. R., Butterworth, D., Camero-Wood, J., Cole, M., Eustace, G. C., M.V., H., M., R., y Chain, E. B. (1960). Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. *Nature* *187*, 236-237.
- Rosell, C. M., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (1993). Resolution of racemic mixtures by synthesis reactions catalyzed by immobilized derivatives of the enzyme penicillin G acylase. *Journal of molecular catalysis* *84*, 365-371.
- Rosell, C. M., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (1995). Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilisation by multipoint covalent attachment. *Biocatalysis y Biotransformation* *12*, 67-76.
- Rosell, C. M., Terreni, M., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (1998). A criterion for the selection of monophasic solvents for enzymatic synthesis. *Enzyme y Microbial Technology* *23*, 64-69.
- Rosevear, A. (1984). Immobilized biocatalysts - A critical review. *Journal of chemical technology y biotechnology Biotechnology* *34 B*, 127-150.
- Royer, G. P. (1980). Immobilized enzymes catalysis reviews. *Catalysis reviews Softcover ed* *22*, 29-73.
- Saidel, L. J., Leitzes, S., y Elfring, J. W. H. (1964). The stability of chymotrypsin cross-linked with formaldehyde. *Biochemical y Biophysical Research Communications* *15*, 409-413.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Third ed. edn (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandgren, M., Gualfetti, P. J., Shaw, A., Gross, L. S., Saldajeno, M., Day, A. G., Jones, T. A., y Mitchinson, C. (2003). Comparison of family 12 glycosyl hydrolases y recruited substitutions important for stability. *Protein Sci* *12*, 848-860.
- Scouten, W. H. (1983). *Immobilized enzymes, solid phase biochemistry* (New York: John Wiley y Sons).
- Schellenberg, A., y Ulbrich, R. (1989). Protein stabilization by blocking the native unfoldin nucleus. *Biomed Biochim Acta* *48*, 63-67.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., y Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today y tomorrow. *Nature* *409*, 258-268.

- Schroeder, M., Heumann, S., Silva, C. J. S. M., Cavaco-Paulo, A., y Guebitz, G. M. (2006). Specificities of a chemically modified laccase from *Trametes hirsuta* on soluble y cellulose-bound substrates. *Biotechnology Letters* 28, 741-747.
  
- Schroen, C., Nierstrasz, V. A., Kroon, P. J., Bosma, R., Janssen, A. E. M., Beeftink, H. H., y Tramper, J. (1999). Thermodynamically controlled synthesis of beta-lactam antibiotics. Equilibrium concentrations y side-chain properties. *Enzyme y Microbial Technology* 24, 498-506.
- Schütz, A., Sandalova, T., Ricagno, S., Hübner, G., König, S., y Schneider, G. (2003). Crystal structure of thiamindiphosphate dependent *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic. *Eur J Biochem* 270, 212-232.
- Sio, C. F., y Quax, W. J. (2004). Improved beta-lactam acylases y their use as industrial biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 349-355.
- Snyder, S. L., y Sobocinski, P. Z. (1975). An improved 2,4,6 trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Analytical Biochemistry* 64, 284-288.
- Soetaert, W., y Vandamme, E. (2006). The impact of industrial biotechnology. *J Biotechnol* 1, 756-769.
- Srere, P. A., y Uyeda, K. (1976). Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices, Vol XLIV ( New York: Academic).
- Stambolieva, N., Mincheva, Z., Galunsky, B., y Kalchova, V. (1992). Penicillin amidase-catalysed transfer of low specific acyl moiety. Synthesis of 7-benzoxazolonylacetamido desacetoxyccephalosporanic acid. *Enzyme y Microbial Technology* 14, 496-500.
- Strop, P., y Mayo, S. L. (2000). Contribution of surface salt bridges to protein stability. *Biochemistry* 39, 1251-1255.
- Subramanian, A., Kennel, S. J., Oden, P. I., Jacobson, K. B., Woodward, J., y Doktycz, M. J. (1999). Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports. *Enzyme y Microbial Technology* 24, 26-34.
- Sudhakaran, V. K., Desphande, B. S., Ambedkar, S. S., y Shewale, J. G. (1992). Molecular aspects of penicillin y cephalosporin acylases. *Process Biochemistry* 27, 131-143.
- Suh, C. W., Park, S. H., Park, S. G., y Lee, E. K. (2005). Covalent immobilization y solid-phase refolding of enterokinase for fusion protein cleavage. *Process Biochemistry* 40, 1755-1762.
- Svedas, V., Guranda, D., van Langen, L., van Rantwijk, F., y Sheldon, R. (1997). Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. *FEBS Letters* 417, 414-418.
- Svedas, V. K., Margolin, A. L., Sherstiuk, S. F., Klyosov, A. A., y Berezin, I. V. (1977). Inactivation of soluble and immobilized penicillin amidase from *E. coli* by

- phenylmethylsulphonylfluoride: Kinetic analysis and titration of the active sites. *Bioorg KHIM (Russ)* **3**, 546-553.
- Swank, R. T., y Munkres, K. D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrilamide gel with sodium dodecyl sulphate. *Analytical Biochemistry* **39**, 462-477.
  - Tann, C. M., Qi, D., y Distefano, M. D. (2001). Enzyme design by chemical modification of protein scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 696-704.
  - Thirumilai, D., Klimov, D. K., y Dima, R. I. (2003). Emerging ideas on the molecular basis of protein y peptide aggregation. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 146-159.
  - Tischer, W., y Kasche, V. (1999). Immobilized enzymes: Crystals or carriers? *Trends in Biotechnology* **17**, 326-335.
  - Tollinger, M., Crowhurst, K. A., Kay, L. E., y Forman-Kay, J. D. (2003). Site-specific contributions to the pH-dependence of protein stability. *Proc Acad Sci USA* **100**, 4545-4550.
  - Torchilin, V. P., Trubetskoy, V. S., Omel'Yanenko, V. G., y Mratinek, K. (1983). Stabilization of subunit enzyme by intersubunit crosslinking with bifunctional reagents: studies with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis* **19**, 291-301.
  - Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres-Guzmán, R., De La Mata, I., Castillo, M. P., y Acebal, C. (2000). Covalent immobilization of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Biotechnology Letters* **22**, 1011-1014.
  - Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Palomo, J. M., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2003). A novel heterofunctional epoxy-amino sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization-stabilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Progress* **19**, 1056-1060.
  - Torres, R., Pessela, B. C. C., Fuentes, M., Mateo, C., Munilla, R., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2006). Supports coated with PEI as a new tool in chromatography. *Enzyme y Microbial Technology* **39**, 711-716.
  - Torres, R., Pessela, B. C. C., Mateo, C., Ortiz, C., Fuentes, M., Guisán, J. M., y Fernández-Lafuente, R. (2004). Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnology Progress* **20**, 1297-1300.
  - Travascio, P., Zito, E., Portaccio, M., Diano, V., Di Martino, S., y al., e. (2002). Enzyme reaction engineering: effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal y non-isothermal conditions. *Biotechnol Prog* **18**, 975-985.
  - Tümtürk, H., y Tufan, Y. (2004). Immobilization of invertase onto dimer acid-co-alkyl polyamine. *Journal of Applied Polymer Science* **93**, 1526-1530.
  - Turunen, O. (2002). Engineering of multiple arginines into ser/thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- $\beta$ -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. *Protein engineering*, **15**, 141-145.

- Tworowski, D., Feldman, A. V., y Safro, M. G. (2005). Electrostatic potential of aminoacyl-tRNA synthetase navigates tRNA on its pathway to the binding site. *Journal of Molecular Biology* 350, 866-882.
- Ulbrich, R., Arnold, U., y Mansfeld, J. (1999). The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. *J Mol Cat B: Enzymatic* 7, 125-131.
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E., y Bolivar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature y in industry. *Trends in Biochemical Sciences* 16, 36-40.
- Van De Sandt, E. J. A. X., y De Vroom, E. (2000). Innovations in cephalosporin y penicillin production: Painting the antibiotics industry green. *Chimica Oggi* 18, 72-75.
- Van Langen, L. M., Oosthoek, N. H. P., Guranda, D. T., Van Rantwijk, F., Svedas, V. K., y Sheldon, R. A. (2000). Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* 11, 4593-4600.
- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebersm, B., Hensel, R., y Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small tetrameric, hyperthermostable, tiophosphate isomerase. *J Mol Biol* 306, 745-757.
- Waldmann, H., Heuser, A., y Schulze, S. (1996). Selective enzymatic removal of protecting groups: The phenylacetamide as amino protecting group in phosphopeptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 37, 8725-8728.
- Wang, P. F., Flynn, A. J., Naor, M. M., Jensen, J. H., Cui, G., Merz Jr, K. M., Kenyon, G. L., y McLeish, M. J. (2006). Exploring the role of the active site cysteine in human muscle creatine kinase. *Biochemistry* 45, 11464-11472.
- Weaver Jr, L. E., y Carta, G. (1996). Protein adsorption on cation exchangers: Comparison of macroporous y gel-composite media. *Biotechnology Progress* 12, 342-355.
- Wegman, M. A., Janssen, M. H. A., Van Rantwijk, F., y Sheldon, R. A. (2001). Towards Biocatalytic Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Advanced Synthesis y Catalysis* 343, 559-576.
- Wheatley, J. B., y Schmidt Jr, D. E. (1999). Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *Journal of Chromatography A* 849, 1-12.
- Wheatly, J. B., y Schmidt, D. E. (1993). Salt induced immobilizations of proteins on a high performance liquid chromatographic epoxide affinity support. *J Chromatogr A* 644, 11-16.
- Wilchek, M., y Miron, T. (2003). Oriented versus random protein immobilization. *Journal of Biochemical y Biophysical Methods* 55, 67-70.
- Wilson, L., Illanes, A., Abiañ, O., Pessela, B. C. C., Fernández-Lafuente, R., y Guisán, J. M. (2004). Co-aggregation of penicillin G acylase y polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules* 5, 852-857.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambair, A. M., y Wierenga, R. K. (1999). Structural y mutagenesis studies of leishmania triphosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic

enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. . *Protein Eng* 12, 243-250.

- Wong, S. S., y Wong, L. J. C. (1992). Chemical crosslinking y the stabilization of proteins y enzymes. *Enzyme y Microbial Technology* 14, 866-874.
- Zaks, A., y Klibanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* 263, 8017-8021.
- Zhang, W., Liu, Y., Zheng, H., Yang, S., y Jiang, W. (2005). Improving the activity y stability of GL-7-ACA acylase CA130 by site-directed mutagenesis. *Applied y Environmental Microbiology* 71, 5290-5296.

# ANEXO

---

---

## PUBLICACIONES DE LA TESIS

- López-Gallego F., **Montes T.**, Fuentes M., Alonso N., Grazu V., Betancor L., Guisán J.M. and Fernández Lafuente R. “Chemical increase of the amount of reactive groups on enzyme surface to improve its stabilization via multipoint covalent attachment”. *J Biotech.*, 2005. 116,. 1-10.
- Valeria Grazu, Lorena Betancor, **Tamara Montes**, Fernando Lopez-Gallego, Jose M. Guisán and Roberto Fernandez-Lafuente. “Glyoxyl agarose as a new chromatographic matriz”. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. 38, 960-966.
- **Tamara Montes**, Fernando López-Gallego, Manuel Fuentes, Cesar Mateo, Valeria Grazu, Lorena Betancor, Jose M. Guisán and Roberto Fernandez-Lafuente. “Improved stabilization of chemically aminated enzymes *via* multipoint covalent attachment on glyoxil supports” en *Immobilization of Enzymes and Cells*, Second edition Ed Guisán, J.M. G. Serie Methods Biotechnol The Humana Press Inc.
- **Tamara Montes**, Valeria Grazú, Fernando López-Gallego, Jose M. Guisán and Roberto Fernández-Lafuente. Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers. *Biomacromolecules*. 2006, 7, 3052-3058.
- **Tamara Montes**, Valeria Grazú, Fernando López-Gallego, Juan A. Hermoso, Jose L. García, Isabel Manso, Beatriz Galán, Ramón González, Roberto Fernández-Lafuente and José M. Guisán. “Genetic modification of the protein surface to improve its reversible immobilization on ionic supports”. *Applied Enviromental Microbiology*. 2006. *In press*.
- **Tamara Montes**, Valeria Grazú, Isabel Manso, Beatriz Galán, Fernando López-Gallego, Ramón Gonzále, Juan A. Hermoso, José L. García, Jose M. Guisán and Roberto Fernández-Lafuente. “Improved stabilization of genetically modified PGA in the presence of organic cosolvents by co-immobilization of the enzyme with PEP”. *Advanced Synthetic Catalysis*. 2006. *In press*.